



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE SPRY1 EN LA PATOGÉNESIS
DEL SARCOMA DE EWING:
IMPLICACIONES PRONÓSTICAS Y
TERAPÉUTICAS**

Memoria presentada por **Florencia Cidre Aranaz**,
Licenciada en Biotecnología, Máster en Biociencias Moleculares,
para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Director de Tesis: Dr. Fco. Javier Alonso García de la Rosa.

Instituto de Investigación en Enfermedades Raras
Instituto de Salud Carlos III
Madrid, 2016

D. Francisco Javier Alonso García de la Rosa, Doctor en Biología y Científico Titular del Instituto de Salud Carlos III,

CERTIFICA:

que **Florencia Cidre Aranaz**, Licenciada en Biotecnología por la Universidad Francisco de Vitoria, Máster en Biociencias Moleculares por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo que lleva por título:

**“Papel de SPRY1 en la patogénesis del sarcoma de Ewing:
Implicaciones pronósticas y terapéuticas”**

el cual considero satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, expido el siguiente certificado en Madrid, a 1 de septiembre de 2016.

Fdo. Fco. Javier Alonso García de la Rosa
Investigador del ISCIII

*Cuando emprendas tu viaje a Ítaca
pide que el camino sea largo,
lleno de aventuras, lleno de experiencias. [...]
Ten siempre a Ítaca en tu mente.
Llegar allí es tu destino.
Mas no apresures nunca el viaje.
Mejor que dure muchos años
y atracar, viejo ya, en la isla,
enriquecido de cuanto ganaste en el camino
sin aguardar a que Ítaca te enriquezca.*

K. Kavafis. Antología poética, 1999.

A mamá

Agradecimientos

Estos últimos 4 años han estado llenos de experiencias y grandes aprendizajes. Nada de esto habría sido posible sin aquellos que de una forma u otra me han ayudado a llegar hasta aquí y por ello les estoy profundamente agradecida.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Javier Alonso por haber puesto a mi disposición los recursos y conocimientos necesarios para el desarrollo de esta Tesis y por su labor de supervisión a lo largo de estos años.

A las instituciones que me han acogido, el Instituto de Salud Carlos III de Madrid (ISCIII) y el Institut Curie de París, cuyas infraestructuras me han permitido desarrollar estos estudios. A la Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC) por la financiación concedida (RD12/0036/0027). Me gustaría agradecer en especial a la Asociación Pablo Ugarte por su fantástica labor, por haber depositado su confianza en nosotros y por haber financiado de forma sostenida este proyecto (TPY-M 1149/13). Espero que esta Tesis haya contribuido a avanzar un pasito más hacia la consecución de vuestro objetivo.

A la Dra. Sonsoles Hortelano, por haberme dado la oportunidad de descubrir este maravilloso mundo y por todo lo que me ha enseñado a lo largo de los años, tanto a nivel profesional como personal. Para mí siempre serás un gran ejemplo. Al Dr. Alfonso Luque, por abrirme las puertas de su laboratorio en mis inicios y por su infinita paciencia a lo largo de los años, siempre dispuesto a enseñar. He sido muy afortunada de haber podido contar con vosotros. Gracias.

Al Dr. Thomas Grünewald, que me enseñó a convertir resultados en historias. Las discusiones científicas que hemos mantenido estos últimos años han sido esenciales para mi formación. Al Dr. Olivier Delattre, por haberme aceptado en su laboratorio en el Institut Curie y por haber hecho todo lo posible porque mi estancia allí fuese una gran experiencia formativa.

Al personal de las unidades centrales del ISCIII, en especial a Fernando y Silvia de Microscopía Confocal y a Raquel de Histología cuyas aportaciones han enriquecido el contenido de esta Tesis.

A todos aquellos con los que he tenido la suerte de compartir estos años en el laboratorio y que tanto me han ayudado. A Lau, por todo lo que me ha enseñado, por su dedicación y por las risas compartidas. Para mí siempre serás estrella dorada en culti. A Carlos, por las charlas, la complicidad y por haber podido contar siempre con su apoyo. A Gema, por haberme animado a seguir y por sus buenos consejos. A Lidia y Sandra por todos los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio y por haberme ayudado tanto. A Ana, Leti, Patri, Bea, Laura Gon y Cristina de nuestro laboratorio y a Javi Castro, Stefano, Isa, MA, Tere, Ander, Patri, Andrés, Irmina, Fernando, Rafa y Nerea del pasillo. A Anneliene y Frank, que iluminaron mi estancia en París con su alegría. Todos vosotros habéis hecho que este periodo haya sido mucho más fácil y, sin duda, mucho más divertido.

A todos los que me habéis acompañado fuera del ámbito científico. A David, por las aventuras vividas, que han sido muchas y memorables. A Pati, por todos los años de sincera amistad y por todo lo que hemos vivido juntas. A Mónica, por regalarme su música y también por haberme metido en más de un berenjenal.

A Javi, por quererme tan bien. Por haber compartido la escritura conmigo y haberla hecho tan dulce.

A mi familia, por haberme enseñado el valor del esfuerzo y haber sabido apoyarme siempre en cada uno de mis proyectos.

A mi Yoyoyo, por haberme acompañado hasta aquí con sus palabras y su recuerdo. Para mí siempre hay un colibrí en el jardín.

A mamá, por el amor y alas, por haber sido siempre ejemplo de rectitud y coraje y por haberme inculcado los valores que me han permitido culminar esta etapa.

A todos vosotros, mi más sincero agradecimiento.

Resumen

El sarcoma de Ewing se caracteriza por la presencia de translocaciones cromosómicas que originan genes de fusión entre el gen *EWSR1* y diferentes miembros de la familia de factores de transcripción *ETS*, principalmente *FLI1*. El gen de fusión resultante, *EWS-FLI1*, es un factor de transcripción aberrante que desempeña un papel central en el origen del sarcoma de Ewing a través de la regulación transcripcional de otros genes diana.

En esta Tesis mostramos que *Sprouty 1 (SPRY1)*, un inhibidor *downstream* de los receptores del factor de crecimiento fibroblástico (FGFRs) y otros receptores activadores de Ras, es un gen regulado negativamente por EWS-FLI1 en células de sarcoma de Ewing A673. El análisis de la expresión de SPRY1 en una selección de células de sarcoma de Ewing mostró que SPRY1 no se expresa en estas líneas celulares, lo que sugiere que SPRY1 podría actuar como un supresor tumoral en células de sarcoma de Ewing. En concordancia con estos resultados, la re-expresión de SPRY1 inhibió la proliferación, el crecimiento clonogénico y la migración en tres líneas celulares diferentes de sarcoma de Ewing. Además, la re-expresión de SPRY1 inhibió la ruta de señalización de Ras/MAPK/ERK inducida por suero o FGFb. Por otro lado, al tratar las células de sarcoma de Ewing con el inhibidor de FGFR PD173074, se redujo la proliferación inducida por FGFb, la formación de colonias y el crecimiento de tumores *in vivo* de forma dependiente de dosis.

Aunque la expresión de SPRY1 en células de sarcoma de Ewing es baja, SPRY1 se expresa de forma variable en las muestras de tumores primarios. El análisis de una cohorte grande de pacientes indica que los pacientes con tumores que presentaron una expresión mayor de SPRY1 tuvieron un mejor pronóstico.

En resumen, los resultados mostrados en esta Tesis indican que la regulación negativa de SPRY1 mediada por EWS-FLI1 produce una desregulación de la proliferación celular inducida por FGFb, lo que sugiere que la ruta de señalización de FGFR/Ras/MAPK/ERK podría ser una diana interesante para el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas para esta devastadora enfermedad.

Summary

Ewing sarcoma is characterized by chromosomal translocations fusing the *EWSR1* gene with various members of the *ETS* family of transcription factors, most commonly *FLI1*. EWS-FLI1 is an aberrant transcription factor driving Ewing sarcoma tumorigenesis by either transcriptionally inducing or repressing specific target genes.

Herein, we showed that *Sprouty 1* (*SPRY1*), which is a physiological negative feedback inhibitor downstream of fibroblast growth factor (FGF) receptors (FGFRs) and other Ras-activating receptors, is an EWS-FLI1 repressed gene. EWS-FLI1 knock-down specifically increased the expression of *SPRY1* while other *Sprouty* family members remained unaffected. Analysis of *SPRY1* expression in a panel of Ewing sarcoma cells showed that *SPRY1* was not expressed in Ewing sarcoma cell lines, suggesting that it could act as a tumor suppressor gene in these cells. In agreement, induction of *SPRY1* in three different Ewing sarcoma cell lines functionally impaired proliferation, clonogenic growth and migration. In addition, *SPRY1* expression inhibited ERK/MAPK signalling induced by serum and basic FGF (bFGF). Moreover, treatment of Ewing sarcoma cells with the potent FGFR inhibitor PD173074 reduced bFGF-induced proliferation, colony formation and *in vivo* tumor growth in a dose-dependent manner, thus mimicking *SPRY1* activity in Ewing sarcoma cells.

Although the expression of *SPRY1* was low when compared to other tumors, *SPRY1* was variably expressed in primary Ewing sarcoma tumors and higher expression levels were significantly associated with improved outcome in a large patient cohort.

Taken together, our data indicate that EWS-FLI1-mediated repression of *SPRY1* leads to unrestrained bFGF-induced cell proliferation, suggesting that targeting the FGFR/Ras/MAPK/ERK pathway can constitute a promising therapeutic approach for this devastating disease.

Índice

1. Introducción	23
1.1. Sarcoma de Ewing: características clínicas	27
1.2. Biología celular de los sarcomas de Ewing	29
1.3. Biología molecular de los sarcomas de Ewing	30
1.3.1. Características oncogénicas de la proteína de fusión	30
1.3.2. Genes diana de EWS-FLI1: oportunidades terapéuticas	34
1.4. La vía de señalización RTK/Ras/ERK en cáncer	37
1.5. <i>Sprouty1</i> (SPRY1)	41
1.5.1. Características moleculares de SPRY1 y otros miembros de la familia de proteínas <i>Sprouty</i>	41
1.5.2. SPRY1: funciones fisiológicas	42
1.5.3. SPRY1 en cáncer	45
2. Objetivos	49
3. Materiales y Métodos	55
3.1. Material biológico	57
3.1.1. Líneas celulares	57
3.1.2. Cohortes de pacientes y tumores primarios	57
3.2. Plásmidos	60
3.3. Establecimiento de líneas celulares de sarcoma de Ewing con expresión inducible de SPRY1	60
3.4. Estudios de expresión	62
3.4.1. Extracción de ARN	62
3.4.2. RT-PCR cuantitativa a tiempo real	62
3.4.3. Estudios de regulación epigenética	65
3.4.4. Western blot	65
3.5. Estudios funcionales	67
3.5.1. Estudios de proliferación celular	67
3.5.2. Estudios de migración celular	70
3.5.3. Estudios de formación de tumores en ratones <i>in vivo</i>	72
3.5.4. Histología y estudios inmunohistoquímicos (IHQ)	73
3.6. Análisis estadísticos	74
4. Resultados	59
4.1. Perfil de expresión de SPRY1 en sarcoma de Ewing: regulación por EWS-FLI1	59
EWS-FLI1 regula negativamente la expresión de SPRY1 en células de sarcoma de Ewing A673	79

La regulación de SPRY1 por EWS-FLI1 en células A673 podría estar mediada por un mecanismo epigenético.....	88
4.2. SPRY1 es un gen supresor de tumores en sarcoma de Ewing	91
Establecimiento de modelos celulares de expresión inducible de SPRY1 en células de sarcoma de Ewing.....	91
La re-expresión de SPRY1 inhibe la proliferación y aumenta el tiempo de duplicación de las células de Ewing.....	93
Efecto de SPRY1 sobre el ciclo celular en células de Ewing.....	96
SPRY1 inhibe el crecimiento de células a baja densidad y la formación de colonias en agar blando.....	98
La re-expresión de SPRY1 inhibe la migración de las células de sarcoma Ewing.....	101
La re-expresión de SPRY1 produce cambios morfológicos en las células de sarcoma de Ewing.....	103
4.3. Efecto de SPRY1 sobre la vía de señalización de las MAPKs	105
La re-expresión de SPRY1 inhibe la vía de señalización Ras/MAPK/ERK en las células de sarcoma de Ewing.....	105
El efecto de la re-expresión de SPRY1 es similar al de los inhibidores de FGFR en células de sarcoma de Ewing.....	107
Análisis del efecto combinado de la re-expresión de SPRY1 y los inhibidores de FGFR sobre la proliferación celular.....	110
4.4. Potencial terapéutico de los inhibidores de FGFR en sarcoma de Ewing.....	113
4.5. SPRY1 podría ser un factor pronóstico en sarcoma de Ewing	118
SPRY1 presenta niveles bajos de expresión, pero variables, en tumores de Ewing con respecto a otras cohortes de tumores sólidos.....	118
Niveles de SPRY1 en líneas celulares vs. tumores primarios.....	119
Niveles de expresión moderados de SPRY1 se asocian a un mejor pronóstico en sarcoma de Ewing.....	121
5. Discusión.....	125
6. Conclusiones.....	143
7. Bibliografía.....	149
8. Anexos.....	173
8.1 Material Suplementario.....	175
8.2 Publicaciones	183

Abreviaturas

5-aza	5-aza-2'-deoxicitidina
abs	Absorbancia
AD	Dominio activador (<i>Activation domain</i>)
ATRT	Tumor teratoideo/rabdoide atípico (<i>Atypical teratoid rhabdoid tumor</i>)
BG-98	NVP-BGJ398 (inhibidor FGFR)
BrdU	Bromodesoxiuridina
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)
Ca-	Carcinoma
c-Cbl	<i>Canonical Casitas B-lineage lymphoma</i>
CCK	Colecistoquinina (<i>Cholecystokinin</i>)
CCLE	<i>Cancer Cell Line Encyclopedia</i>
CRD	Dominio rico en cisteínas (<i>Cysteine-rich domain</i>)
Ct	Ciclo umbral (<i>Cycle Threshold</i>)
DBD	Dominio de unión al ADN (<i>DNA Binding Domain</i>)
DOX	Doxiciclina
EAD	Dominio de regulación de secuencia potenciadora (<i>Enhancer activation domain</i>)
EBI	<i>European Bioinformatics Institute</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidérmico (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
ERK1/2	Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>)
EWS	Sarcoma de Ewing (<i>Ewing sarcoma</i>)
ETS	Factor específico de transformación E26 (<i>E26 transformation-specific</i>)
ETS-DBD	Dominio ETS de unión al ADN (<i>ETS DNA binding domain</i>)
EWSR1	Proteína de unión al ARN de sarcoma de Ewing (<i>Ewing Sarcoma RNA-binding protein 1</i>)
FGFb	Factor de crecimiento fibroblástico básico (<i>Fibroblast Growth Factor basic</i>)
FGFR	Receptor de factor de crecimiento fibroblástico básico (<i>Fibroblast growth factor receptor</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein isotiocyanate</i>)
FOXM1	<i>Forkhead box protein M1</i>
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GIST	Tumor estromal gastrointestinal (<i>Gastrointestinal stromal tumor</i>)
GLI1	Oncogén asociado a glioma, homólogo 1 (<i>Glioma-Associated Oncogene Homolog 1</i>)
GTEx	<i>Genotype-Tissue Expression</i>
Grb2	Proteína unida a factor de crecimiento 2 (<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>)
HDAC	Desacetilasa de histonas (<i>Histone deacetylase</i>)
HGFR	Factor de crecimiento de hepatocitos (<i>Hepatocyte growth factor receptor</i>)

HNRNPH1	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea H1, (<i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein H1</i>)
IFN	Interferón
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico 1 (<i>Insulin Growth Factor 1</i>)
IGF-1R	Receptor de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (<i>Insulin Growth Factor 1 Receptor</i>)
IGFBP-3	Proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 3 (<i>Insulin Growth Factor Binding Protein 3</i>)
IR	Receptor de insulina (<i>Insulin receptor</i>)
LOX	Lisil oxidasa (<i>Lysyl-oxidase</i>)
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MSC	Célula madre mesenquimal (<i>Mesenchymal stem cell</i>)
NGF	Factor de crecimiento nervioso (<i>Nerve growth factor</i>)
NR0B1	Receptor nuclear, subfamilia 0, grupo B, miembro 1 (<i>Nuclear Receptor Subfamily 0, Group B, Member 1</i>)
NSCLC	Carcinoma de pulmón no microcítico (<i>Non-small cell lung cancer</i>)
PD-66	PD166866 (inhibidor de FGFR)
PD-74	PD173074 (inhibidor de FGFR)
PDGFR	Receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa (<i>Phosphatidylinositide 3-kinases</i>)
AKT (o PKB)	Proteína quinasa B (<i>Protein kinase B</i>)
PNET	Tumor neuroectodérmico primitivo (<i>Primitive Neuroectodermal Tumor</i>)
PRKCB	Proteína quinasa C-β (<i>Protein kinase C-β</i>)
Ras	<i>Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
Rho	Homólogo de Ras (<i>Ras homolog</i>)
RMS	Rabdomiosarcoma
RRM	Motivo de reconocimiento de ARN (<i>RNA recognition motif</i>)
RTK	Receptor de tirosina quinasa (<i>Receptor Tyrosine Kinase</i>)
SFB	Suero fetal bovino
SFB-TET	Suero fetal bovino sin tetraciclina
SPRED	Proteínas relacionadas con Sprouty con dominio EVH-1 (<i>Sprouty-related proteins with an EVH-1 domain</i>)
SPRY	<i>Sprouty</i>
SRM	Motivo rico en serinas (<i>Serine-rich motif</i>)
Src	<i>Stored response chain</i>
STR	Secuencias cortas repetitivas en serie (<i>Short tandem repeats</i>)
SU54	SU5402 (inhibidor de FGFR)
TAF15	Factor 15 asociado a la proteína de unión a secuencias TATA (<i>TATA-binding protein-associated factor 15</i>)
TBP	Proteína de unión a secuencias TATA (<i>TATA Binding Protein</i>)
TCR	Receptor de células T (<i>T cell receptor</i>)
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β (<i>Transforming Growth Factor β</i>)
TKB	Dominio de unión a tirosina (<i>Tyrosine kinase-binding domain</i>)
TLS	Translocado en liposarcoma (<i>Translocated in liposarcoma</i>)

TLS/FUS	Translocado en liposarcoma/Fusión (<i>Translocated in Liposarcoma/Fusion</i>)
TR	Represor de tetraciclina (<i>Tetracycline repressor</i>)
uPAR	Receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (<i>Urokinase plasminogen activator receptor</i>)
VDC/IE	Vincristina, Doxorrubicina, Ciclofosfamida/Ifosfamida-Etopósido
VEGFR	Receptor de factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>)
VIDE	Vincristina, Ifosfamida, Doxorrubicina, Etopósido
VT	Variante transcripcional

1. Introducción

1.1. Sarcoma de Ewing: características clínicas.

El sarcoma de Ewing es la segunda neoplasia ósea más frecuente en niños y adolescentes, por detrás del osteosarcoma (Gaspar *et al.* 2015). Presenta una incidencia de 3 casos por millón de individuos menores de 15 años y aparece en una proporción ligeramente superior en varones frente a mujeres (3:2). Además, la incidencia es mayor en la población caucásica en comparación con la población asiática o africana (Khoury 2005, Esiashvili *et al.* 2008, Beck *et al.* 2012). Según datos de la Sociedad Española de Hemato-Oncología Pediátricas (SEHOP) y el Registro Español de Tumores Infantiles (RETI) se diagnostican en España aproximadamente 30 nuevos casos al año.

El sarcoma de Ewing aparece normalmente como masas destructivas asociadas a hueso que suelen extenderse al tejido circundante, aunque en un 15% de los casos se desarrollan en tejidos blandos sin asociación a tejidos óseos (Grier 1997). Los huesos más frecuentemente afectados son la pelvis (31%), el fémur (20%) y la tibia (11%). Entre un 15-30% de los casos presentan metástasis al diagnóstico, localizadas principalmente en el pulmón (50%), huesos (25%) y en médula ósea (25%) (Arvand and Denny 2001).

Desde un punto de vista histológico, el sarcoma de Ewing está formado por una población homogénea de células pequeñas, redondeadas e indiferenciadas con escaso citoplasma y núcleos redondos e hipercromáticos. El sarcoma de Ewing comparte características histopatológicas similares con otras entidades como el tumor de Askin y el tumor neuroectodérmico primitivo (PNET, *Primitive Neuroectodermal Tumor*). Por esta razón, todas estas variantes se las englobaron tradicionalmente bajo el nombre de tumores de la familia Ewing.

El sarcoma de Ewing presenta características histológicas similares a otros tipos de tumores pediátricos como los neuroblastomas, rabdomiosarcomas, los tumores desmoplásicos de células redondas y pequeñas y algunos linfomas (Triche 1988). Por ello, el diagnóstico diferencial se realizaba por exclusión, de forma que los tumores de Ewing se definían como neoplasias de células redondas y pequeñas que carecieran de las características bioquímicas y estructurales de neuroblastos (neuroblastomas), músculo esquelético primitivo (rabdomiosarcoma), células epiteliales (carcinoma) o

células linfoides (linfoma), fundamentalmente presentes en niños y con menor frecuencia en adultos. Actualmente, el diagnóstico histológico diferencial se realiza empleando marcadores inmunohistoquímicos como MIC2/CD99, presente en la mayoría de los sarcomas de Ewing (Kovar *et al.* 1990, Perlman *et al.* 1994), aunque no es totalmente específico dado que también se expresa en otros tipos de tumores de células redondas y pequeñas como los rabdomiosarcomas o los sarcomas sinoviales poco diferenciados (Hibshoosh and Lattes 1997, Folpe *et al.* 2000).

A pesar de las mejoras en los tratamientos que se consiguieron en los años 70-80 con la incorporación de la quimioterapia a los regímenes de tratamiento (revisado en Grohar and Helman 2013), los niveles de supervivencia siguen siendo hoy en día inadmisiblemente bajos, especialmente en pacientes con metástasis óseas al diagnóstico o que experimentan una recaída: la supervivencia libre de eventos a 5 años es del 85% en pacientes con enfermedad localizada, mientras que en el caso de presentar metástasis la supervivencia es inferior al 25% (revisado en Hamilton *et al.* 2015, Jackson *et al.* 2016).

Actualmente el sarcoma de Ewing se trata con protocolos complejos que constan de una fase de quimioterapia de inducción, seguida por tratamiento local del tumor mediante cirugía y/o radioterapia y una fase de quimioterapia de consolidación (Rodríguez-Galindo *et al.* 2003). Los protocolos de tratamiento se han ido perfeccionando gracias a la organización de ensayos clínicos cooperativos internacionales. En 1999 se lanzó el programa Euro Ewing para poner en marcha en el contexto de la Unión Europea ensayos clínicos de carácter coordinado, colaborativo e internacional en pacientes con sarcoma Ewing, con el objetivo de contribuir a mejorar la supervivencia de los pacientes. En la actualidad hay dos grandes ensayos clínicos en marcha: el ensayo *Euro Ewing 2012* (EudraCT 2012-002107-17) para nuevos casos diagnosticados y *rEE Cur* (EudraCT 2014-000259-99) para casos recurrentes o refractarios al tratamiento. En el caso de *Euro Ewing 2012*, se está comparando por un lado la combinación VIDE (Vincristina, Ifosfamida, Doxorrubicina, Etopósido) frente a la combinación VDC/IE (Vincristina, Doxorrubicina, Ciclofosfamida e Ifosfamida-Etopósido) y por otro la adición del ácido zoledrónico al tratamiento quimioterapéutico de consolidación. En paralelo se están realizando estudios biológicos para buscar nuevos marcadores

pronósticos para obtener una mejor estratificación de los pacientes y detectar potenciales intolerancias a las terapias.

1.2. Biología celular de los sarcomas de Ewing

La célula de origen del sarcoma de Ewing sigue siendo en la actualidad un tema controvertido para el que, a pesar de los esfuerzos conjuntos, todavía no se ha llegado a un consenso definitivo (Kovar *et al.* 2016). Históricamente, la hipótesis más aceptada era que los tumores de Ewing derivaban de células puripotenciales de la cresta neural, dado que algunos tumores de Ewing presentaban características de tipo neuronal, como la expresión de la enzima catecol acetil transferasa y de la enolasa específica de neurona. Por otro lado, ciertas líneas celulares de Ewing forman dendritas primitivas y expresan proteínas asociadas a neuronas en respuesta a agentes diferenciadores y comparten un perfil de expresión génico semejante al de las células derivadas de la cresta neural (Cavazzana *et al.* 1987, Noguera *et al.* 1992, O'Regan *et al.* 1995, Arvand *et al.* 2001, Staeger *et al.* 2004). Recientemente se ha descrito que las células derivadas de la cresta neural son permisivas a la expresión de EWS-FLI1 y son susceptibles a la immortalización mediada por este oncogén, lo que apoyaría la hipótesis de que las células de sarcoma de Ewing podrían provenir de la transformación de células derivadas de la cresta neural (von Levetzow *et al.* 2011).

Sin embargo, en otros estudios se ha propuesto un posible origen mesenquimal. Según esta teoría, las células madre mesenquimales adultas (MSC; *mesenchymal stem cells*) sufrirían un bloqueo de la diferenciación promovido por EWS-FLI1, que unido a la inducción de otras características tumorigénicas, desencadenaría el desarrollo del sarcoma de Ewing. Hay varios trabajos experimentales que apoyarían esta teoría. Por ejemplo, el silenciamiento de EWS-FLI1 induce la re-expresión de marcadores de MSC (CD44, CD54, CD59 y CD73) así como la diferenciación a adipocitos, osteoblastos y condrocitos, que es una de las principales características de las células madre mesenquimales (Tirode *et al.* 2007). Además, las MSC humanas son permisivas a la expresión de EWS-FLI1 y su sobre-expresión en estas células induce la expresión de marcadores específicos de células de Ewing (Riggi *et al.* 2008) además de conferirles un fenotipo similar al observado en las células de sarcoma de Ewing (Miyagawa *et al.* 2008). Por otro lado, recientemente se ha descrito que en MSC humanas la expresión

ectópica de EWS-FLI1 induce la expresión de genes de células madre embrionarias como *OCT4*, *SOX2*, y *NANOG* (Riggi *et al.* 2010) y del represor *EZH2* (Richter *et al.* 2009). Esto sugiere que EWS-FLI1 podría estar contribuyendo al mantenimiento de un estado indiferenciado en sarcoma de Ewing al regular estos genes propios de células madre (Lessnick and Ladanyi 2012).

Finalmente, dado que por un lado en la médula ósea existen MSC que derivan de progenitores neurales y que las células de la cresta neural presentan la plasticidad propia del linaje mesenquimal, Riggi y colaboradores han sugerido que los dos posibles orígenes (mesenquimal y neural) no tendrían por qué ser excluyentes (Riggi *et al.* 2009).

1.3. Biología molecular de los sarcomas de Ewing.

1.3.1. Características oncogénicas de la proteína de fusión.

Desde un punto de vista molecular, la principal característica de los sarcomas de Ewing es la presencia de una translocación cromosómica que da lugar a la fusión del gen *EWSR1* (*Ewing Sarcoma RNA-binding protein 1*), que pertenece a la familia de proteínas TET (formada por las proteínas *Translocated in liposarcoma (TLS)*, *Ewing sarcoma (EWS)* y *TATA-binding protein-associated factor 15 (TAF15)*) con alguno de los genes que codifican para factores de transcripción de la familia *ETS* (*E26 transformation-specific*), como *FLI1*, *ERG*, *FEV*, *E1AF* y *ETV1*. Asimismo, se ha descrito la fusión del gen *TLS/FUS* (*Translocated in Liposarcoma/Fusion*), también de la familia TET, con el gen que codifica para el factor de transcripción *ERG* (Tabla 1).

Como se muestra en la Figura 1, la proteína EWS tiene un dominio de unión al ARN (RRM: *RNA recognition motif*) en la zona C-terminal y un dominio de activación transcripcional (EAD; *Enhancer activation domain*) en la región N-terminal que contiene múltiples repeticiones de hexapéptidos degenerados (Lessnick *et al.* 1995). FLI1 (al igual que el resto de factores de transcripción ETS) tiene un dominio de unión al ADN (DBD, *DNA Binding Domain*) que reconoce específicamente secuencias GGAA/T en el ADN (Donaldson *et al.* 1994, Truong and Ben-David 2000) y un dominio de transactivación en el N-terminal (AD). Al formarse la proteína de fusión, el

dominio de transactivación de FLI1 es reemplazado por la región N-terminal de EWS que contiene el dominio de transactivación, dando lugar a EWS-FLI1, que tiene una capacidad de activación transcripcional muy superior a la de FLI1 nativo (May *et al.* 1993b).

Tabla 1. Tipos de translocaciones y los genes de fusión correspondientes encontrados más frecuentemente en sarcoma de Ewing

Tipo de Translocación	Gen de fusión	Frecuencia	Referencia
t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1	90-95 %	Delattre <i>et al.</i> 1992
t(21;22)(q22;q12)	EWS-ERG	5-10 %	Zucman <i>et al.</i> 1993, Sorensen <i>et al.</i> 1994
t(7;22)(p22;q12)	EWS-ETV1	< 1 %	Jeon <i>et al.</i> 1995
t(2;22)(q33;q12)	EWS-FEV	< 1 %	Peter <i>et al.</i> 1997
t(17;22)(q12;q12)	EWS-E1AF	< 1 %	Kaneko <i>et al.</i> 1997, Urano <i>et al.</i> 1998
t(16;21)(p11;q22)	FUS-ERG	< 1 %	Shing <i>et al.</i> 2003

Por otro lado, la implicación de diferentes combinaciones de exones da lugar a distintos tipos de fusiones. La fusión denominada de tipo I es la más frecuente y consiste en la fusión del exón 7 de *EWSR1* con el exón 6 de *FLI1*. Se han descrito 12 tipos más de fusiones EWS-FLI1 y al menos 5 tipos de fusiones EWS-ERG (Zucman *et al.* 1993, Zoubek *et al.* 1994, Ginsberg *et al.* 1999).

Actualmente se sabe que las proteínas de fusión EWS-ETS se localizan en el núcleo y se unen al ADN a través del reconocimiento de secuencias específicas, actuando como activadores o represores de la transcripción (Erkizan *et al.* 2010). Sin embargo, estos factores de transcripción quiméricos requieren también de la participación de otras proteínas para desempeñar su función, como el factor de transcripción AP-1 (Kim *et al.* 2006) o la ARN helicasa A, que actúa como un cofactor transcripcional (Toretsky *et al.* 2006). Además, en los tumores de la familia Ewing, estas translocaciones características pueden ir acompañada de otras alteraciones genéticas como la delección en homocigosis del locus p16, presente en el 20-30% de los tumores de Ewing (Kovar *et al.* 1997), la translocación t(1;16) en el 20% de los casos, delecciones en 1p36 en el 18% de los casos,

ganancias cromosómicas del cromosoma 8 (trisomía) en el 35-55% de los casos y del cromosoma 12 en el 25% de los casos (Armengol *et al.* 1997, Hattinger *et al.* 1999) y ganancias en 1q (1qG) (Mackintosh *et al.* 2012).

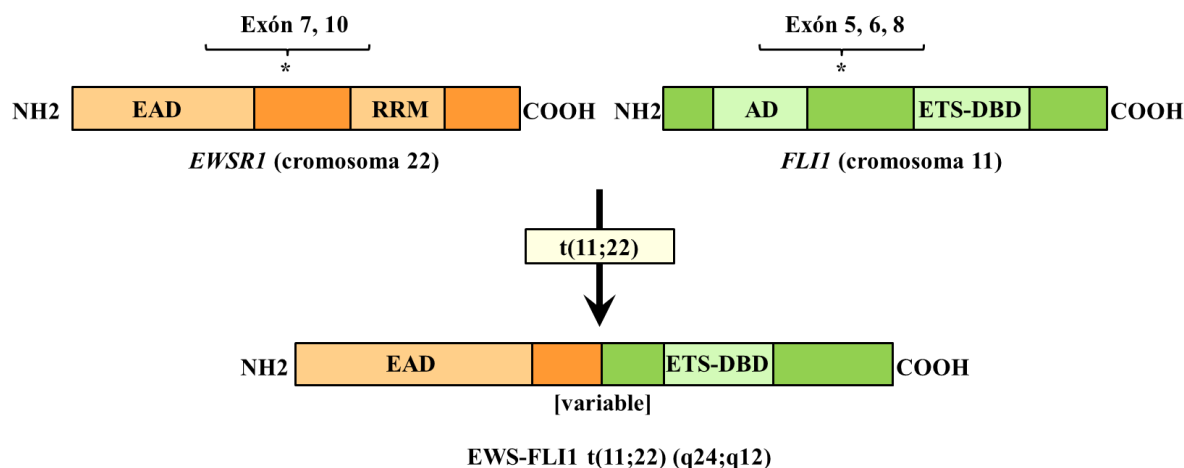


Figura 1. Esquema de la fusión EWS-FLI1 producida por la translocación $t(11;22)(q24;q12)$ en sarcomas de Ewing. La fusión EWS-FLI1 se genera por la unión del dominio activador de *EWSR1* (EAD) localizado en la región N-terminal, que contiene múltiples repeticiones de hexapéptidos degenerados, y el dominio ETS de unión al ADN en la región C-terminal (ETS-DBD; *ETS DNA binding domain*) de *FLI1*. El motivo de reconocimiento a ARN de EWS (RRM; *RNA recognition motif*) y el dominio activador de *FLI1* (AD; *activation domain*) no forman parte de la fusión. Los diferentes tipos de fusiones se generan por variaciones en los puntos de ruptura de los cromosomas, que dan lugar a la fusión de diferentes exones de cada una de las proteínas que originan la fusión (asteriscos) (Modificado de Anderson *et al.* 2012).

El mantenimiento del fenotipo tumoral en el sarcoma de Ewing depende fundamentalmente de la expresión de EWS-FLI1. Este hecho ha quedado suficientemente demostrado a lo largo de los últimos años mediante el empleo de diferentes estrategias experimentales. Así, varios estudios han demostrado que la inhibición de EWS-FLI1 en células de Ewing mediante la utilización de ARN antisentido o ARN de interferencia inhibía la proliferación, aumentaba la susceptibilidad a la apoptosis y limitaba la capacidad transformante *in vitro* e *in vivo* (Ouchida *et al.* 1995, Kovar *et al.* 1996, Tanaka *et al.* 1997, Toretsky *et al.* 1997, Lambert *et al.* 2000, Hu-Lieskovan *et al.* 2005). Por otro lado, la expresión de la proteína de fusión EWS-FLI1 en fibroblastos normales de ratón resulta suficiente para desencadenar la adquisición de características propias de las células tumorales como el crecimiento independiente de anclaje o la formación de tumores histológicamente similares al sarcoma de Ewing en ratones inmunodeprimidos, mientras que la expresión

de FLI1 nativo carece de ese efecto (May *et al.* 1993a, May *et al.* 1993b, Yi *et al.* 1997, Thompson *et al.* 1999).

Como hemos mencionado anteriormente, las propiedades oncogénicas de EWS-FLI1 dependen de su capacidad de unión al ADN, que reside en la región C-terminal derivada del miembro de la familia ETS que forma parte de la proteína de fusión. De hecho, la inactivación de este dominio provoca una reducción de la capacidad transformante de la proteína quimérica (May *et al.* 1993b, Jaishankar *et al.* 1999). Por otro lado, EWS-FLI1 es capaz de activar la transcripción a través del dominio N-terminal de EWS (May *et al.* 1993a, Ohno *et al.* 1993, Bailly *et al.* 1994, Mao *et al.* 1994) dado que la delección de este dominio transactivador reduce el potencial oncogénico de EWS-ETS (Lessnick *et al.* 1995).

La regulación de la transcripción de otros genes es determinante para el desarrollo de los tumores de Ewing y puede ocurrir de forma directa o indirecta. Cuando la regulación es directa, EWS-FLI1 se une a motivos ETS o a repeticiones de elementos GGAA de determinados microsatélites que se localizan cerca de los promotores de los genes que regula. Estos microsatélites se encuentran en mayor proporción cerca de los genes inducidos por EWS-FLI1. Por el contrario, estos elementos de respuesta GGAA no se encuentran cerca de los promotores de los genes reprimidos por EWS-FLI1. Además, se ha visto que la activación de la transcripción depende del número de repeticiones GGAA presentes en el promotor de los genes regulados y que una unión cooperativa o un aumento en la probabilidad de unión debido a la alta concentración de sitios de unión podrían explicar esta correlación (Gangwal *et al.* 2008, Garcia-Aragoncillo *et al.* 2008, Guillon *et al.* 2009, Gangwal *et al.* 2010, Bilke *et al.* 2013, Grunewald *et al.* 2015).

Por otro lado, aunque EWS-FLI1 y FLI1 poseen el mismo dominio de unión al ADN, en realidad se unen a regiones diferentes del genoma. Esto se debe a que EWS-FLI1 adquiere la capacidad de alterar la cromatina, generando una depleción de nucleosomas de ciertas regiones genómicas diana que da lugar a la desregulación transcripcional característica del sarcoma de Ewing (Patel *et al.* 2012). Estos eventos de remodelación de la cromatina mediados por EWS-FLI1 pueden consistir en el desplazamiento de otros factores de transcripción nativos más activos, en el caso de genes reprimidos; o bien en abrir la cromatina y reclutar complejos de remodelación de la cromatina a zonas que

previamente carecían de función reguladora para el caso de genes inducidos por EWS-FLI1 (Riggi *et al.* 2014).

Recientemente se ha descrito que EWS-FLI1 posee un efecto sobre el epigenoma de la célula de Ewing: mediante técnicas de ChIP-seq (*Chromatin Immunoprecipitation-sequencing*) se ha demostrado que la inhibición de la expresión de EWS-FLI1 en células de sarcoma de Ewing genera cambios importantes en las marcas epigenéticas de promotores, *enhancers* y *super enhancers*, siendo la acetilación de la histona H3K27 la marca más afectada (Tomazou *et al.* 2015).

En resumen, existen varios mecanismos, tanto directos como indirectos a través de los cuales EWS-FLI1 es capaz de modular la expresión génica y, en consecuencia, regular el proceso tumoral.

1.3.2. Genes diana de EWS-FLI1: oportunidades terapéuticas

Actualmente existe una necesidad acuciante de encontrar nuevas terapias dirigidas que ofrezcan una mayor eficacia y menores efectos adversos que las terapias convencionales centradas en la quimio y radioterapia usadas hasta el momento. En este sentido, resulta clave ampliar el conocimiento de las bases moleculares implicadas en la patogénesis del sarcoma de Ewing con el objetivo de diseñar nuevas terapias biológicas dirigidas.

EWS-FLI1 induce una desregulación masiva de la expresión génica en sarcoma de Ewing mediante la inducción o inhibición a nivel transcripcional de numerosos genes diana, muchos de los cuales están implicados en el proceso oncogénico (revisado en Lessnick and Ladanyi 2012, Kovar 2014, Cidre-Aranaz and Alonso 2015). Por ejemplo, EWS-FLI1 induce la expresión de *NR0B1* (*DAX1*), *TOPK*, *EGR2*, *NKX2.2*, *CCK*, *PRKCB* y *STEAP1* (Smith *et al.* 2006, Carrillo *et al.* 2007, Garcia-Aragoncillo *et al.* 2008, Herrero-Martin *et al.* 2009, Grunewald *et al.* 2012, Grunewald *et al.* 2015, Surdez *et al.* 2012), mientras que inhibe la expresión de otros genes como *IGFBP3*, *LOX*, *DKK1* o *TGF-beta RII* (Hahm *et al.* 1999, Prieur *et al.* 2004, Navarro *et al.* 2010, Agra *et al.* 2013).

A continuación se describen algunos genes diana de EWS-FLI1 que podrían emplearse como punto de partida para el desarrollo de abordajes terapéuticos más específicos:

- La opción posiblemente más evidente consistiría en bloquear la expresión del factor de transcripción EWS-FLI1 o inhibir su actividad. Este abordaje se ha llevado a cabo con éxito *in vitro* y en modelos animales mediante la utilización de tecnologías de ARN de interferencia o similares (Ouchida *et al.* 1995, Kovar *et al.* 1996, Tanaka *et al.* 1997, Toretsky *et al.* 1997, Yi *et al.* 1997, Lambert *et al.* 2000, Prieur *et al.* 2004, Hu-Lieskovan *et al.* 2005). Sin embargo, su aplicación clínica requiere el desarrollo de tecnologías más seguras y efectivas. Por otro lado, el desarrollo de fármacos contra EWS-FLI1 es una tarea compleja debido a que se trata de un factor de transcripción y por tanto de localización nuclear. En este sentido, Barber-Rotenberg y colaboradores han demostrado recientemente que otra de las funciones oncogénicas de EWS-FLI1 es la alteración del *splicing* de ARN y que este efecto puede ser inhibido por una molécula pequeña llamada YK-4-279 que interacciona con la ARN helicasa A (Barber-Rotenberg *et al.* 2012). Sin embargo, actualmente se desconoce su sitio de unión exacto a EWS-FLI1 y no se ha visto que su utilización tenga un impacto en la regulación transcripcional de otros genes dianas de EWS-FLI1 (Kovar *et al.* 2016). Recientemente se ha analizado también el efecto de los análogos de mitramicina, un antineoplásico que ya se había testado previamente en sarcoma de Ewing con buenos resultados pero elevada toxicidad en ensayos clínicos en fase II, y se ha visto que dos de ellos (EC-8105 y EC-8042) inhiben la actividad transcripcional de EWS-FLI1 y la formación de tumores en modelos de xenotransplante *in vivo*, por lo que podrían representar buenas aproximaciones terapéuticas (Osgood *et al.* 2016). También se ha estudiado el efecto de la trabectedina (ET-743, Yondelis), ya aprobado en Europa para el tratamiento de sarcomas de tejido blando. En sarcoma de Ewing se ha visto que la trabectedina inhibe la actividad transcripcional de EWS-FLI1 (Grohar *et al.* 2011). Este compuesto ha sido estudiado en un ensayo clínico de fase II en pacientes en recaída y se ha visto que la trabectedina no presentaba suficiente actividad como para ser empleado como agente único (Baruchel *et al.* 2012). Sin embargo, recientemente se ha descrito que su uso en combinación con olaparib (un inhibidor de PARP) podría aumentar la sensibilidad *in vitro* e *in vivo* al tratamiento en sarcoma de Ewing (Ordóñez *et al.* 2015), lo que podría suponer una nueva posibilidad para la

utilización de este fármaco. Por otro lado, Grohar y colaboradores identificaron que el *splicing* de los transcritos primarios de EWS-FLI1 mediado por elementos de la maquinaria de *splicing* como HNRNPH1 (ribonucleoproteína nuclear heterogénea H1) es necesario para la correcta expresión de EWS-FLI1 y que el *knock-down* de HNRNPH1 altera la expresión de la proteína EWS-FLI1 y la posterior transcripción regulada por ella (Grohar *et al.* 2016). Esto sugiere que el procesamiento del ARNm de EWS-FLI1 podría ser una interesante diana en sarcoma de Ewing.

- La ruta del **IGF-1** (*Insulin Growth Factor 1*) es clave para la supervivencia celular de los tumores de Ewing y algunos de sus elementos, como la IGFBP-3 (*Insulin Growth Factor Binding Protein 3*), son regulados por EWS-FLI1 (Yee *et al.* 1990, Mitsiades *et al.* 2004, Prieur *et al.* 2004, Kim *et al.* 2005). Varios estudios preclínicos han evaluado el efecto terapéutico de la quimioterapia convencional en combinación con anticuerpos específicos dirigidos contra el receptor de IGF-1 (IGF-1R) (Kolb *et al.* 2008, Olmos *et al.* 2010) o inhibidores de su actividad tirosina quinasa como NVP-AEW541 o NVP-ADW742 (Benini *et al.* 2001, Scotlandi *et al.* 2002b, Martins *et al.* 2006, Manara *et al.* 2007). Lamentablemente, los buenos resultados obtenidos en estos estudios, no se han visto reproducidos en los ensayos clínicos en pacientes (Gaspar *et al.* 2015).
- **NR0B1** (*Nuclear Receptor Subfamily 0, Group B, Member 1*), es una diana directa de EWS-FLI1 que se expresa a elevados niveles en sarcoma de Ewing y cuya inhibición reduce la proliferación celular y el crecimiento tumoral *in vivo* (García-Aragoncillo *et al.* 2008). Por ello, una posible estrategia podría consistir en la inhibición farmacológica de **NR0B1** (Cidre-Aranaz and Alonso 2015).
- **CCK** (*Cholecystokinin*) es un neuropéptido inducido por EWS-FLI1 que actúa como un factor autocrino para las células de sarcoma de Ewing. Un antagonista de los receptores de CCK (*Devazepide*) mostró ciertos efectos antitumorigénicos *in vitro* e *in vivo* (Carrillo *et al.* 2007, Carrillo *et al.* 2009).
- **LOX** (Lisil-oxidasas), es un gen fuertemente reprimido por EWS-FLI1 (Agra *et al.* 2013), expresado a muy bajos niveles en sarcoma de Ewing. Uno de los fragmentos de la proteína, denominado propéptido de LOX (LOX-PP) posee actividad antitumoral en sarcoma de Ewing (Agra *et al.* 2013). Este péptido podría administrarse solo o en combinación con quimioterapia tradicional (Cidre-Aranaz and Alonso 2015).

- **PRKCB** (*protein kinase C-β*) es una diana directa de EWS-FLI1 inducida en sarcoma de Ewing y responsable de la fosforilación de la histona H3T6 cuya inhibición induce apoptosis *in vitro* e inhibe el desarrollo tumoral *in vivo* de esta neoplasia (Surdez *et al.* 2012). Se ha observado que el tratamiento con el inhibidor de PRKCB enzastaurina o la inhibición de su expresión mediante ARN de interferencia disminuye significativamente el tamaño de los tumores en modelos de xenotransplante (Surdez *et al.* 2012).
- **FOXM1** (*Forkhead box protein M1*), es un gen inducido por EWS-FLI1 y su inhibición reduce la tumorigenicidad de las células de sarcoma de Ewing *in vitro* (Gartel 2011). Desde un punto de vista terapéutico, se ha visto que el tratamiento con tiosstreptona, un antibiótico natural, bloquea la expresión de FOXM1 en las células de sarcoma de Ewing, disminuyendo así sus características oncogénicas (Gartel 2011).

En resumen, el estudio de genes diana de EWS-FLI1 ha contribuido a aumentar el conocimiento sobre esta devastadora enfermedad y ha posibilitado el análisis de nuevas terapias que podrían ser de utilidad para el tratamiento del sarcoma de Ewing.

1.4. La vía de señalización RTK/Ras/ERK en cáncer

El mantenimiento y la proliferación de las células tumorales depende en gran medida de la activación autocrina o paracrina de receptores de factores de crecimiento. Los receptores de tirosina quinasa (RTK; *Receptor Tyrosine Kinase*) son una familia de proteínas de la membrana celular que actúan como receptores de factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, factores neurotróficos y otras moléculas extracelulares (revisado en Regad 2015). Los RTK son mediadores de vías de señalización involucradas en proliferación celular, diferenciación, supervivencia y migración celular (revisado en Lemmon and Schlessinger 2010).

La familia de RTK incluye varias subfamilias: los receptores de los factores de crecimiento epidérmicos (*epidermal growth factor receptors* (EGFR)), receptores de los factores de crecimiento fibroblástico (*fibroblast growth factor receptors* (FGFR)), receptores de insulina y de factores de crecimiento insulínicos (*insulin y insulin-like growth factor receptors* (IR y IGFR)), receptores de los factores de crecimiento derivados de plaquetas (*platelet-derived growth factor receptors* (PDGFR)), receptores

de los factores de crecimiento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor receptors* (VEGFR)), receptores de los factores de crecimiento de hepatocitos (*hepatocyte growth factor receptors* (HGFR)), y el proto-oncogén c-KIT (Li and Hristova 2006, Hubbard and Miller 2007).

Muchos tumores presentan mutaciones que afectan a la actividad de RTKs o a los componentes *downstream* de la vía de señalización, como las MAP quinasas (MAPK; *Mitogen-Activated Protein Kinases*) o PI3K/AKT (*phosphatidylinositide 3-kinases/Protein kinase B*), desregulando la proliferación, supervivencia, capacidad invasiva y metastásica de las células y desencadenando la transformación maligna (revisado en Low and Zhang 2016).

En el caso particular del sarcoma de Ewing, uno de los efectos de la translocación EWS-FLI1 es la desregulación de la ruta de señalización mediada por IGF-1R (*insulin growth factor 1 receptor*), lo que contribuye en gran medida al mantenimiento del fenotipo tumoral de estas neoplasias (Karnieli *et al.* 1996, Scotlandi *et al.* 1998, Scotlandi *et al.* 2002a, Leavey and Collier 2008, Herrero-Martin *et al.* 2009). Esto ha convertido a la ruta de IGF-1R en una posible diana terapéutica en el sarcoma de Ewing que ha sido testada en numerosos ensayos clínicos mediante el empleo de diferentes drogas, incluyendo anticuerpos monoclonales contra IGF-1R y antagonistas específicos, aunque de momento los resultados no han sido tan favorables como se esperaba (Olmos *et al.* 2010, Naing *et al.* 2012, Schoffski *et al.* 2013, Pappo *et al.* 2014).

Por otro lado, ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase 1/2*), otro de los componentes fundamentales de la ruta RTK/Ras/ERK, se encuentra activado de forma aberrante en un tercio de los cánceres humanos (Schubbert *et al.* 2007). Es interesante destacar además que la mayoría de los eventos pro-oncogénicos que dan lugar a la activación constitutiva de la señalización de ERK1/2 ocurren *upstream* ERK1/2, a nivel del RTK o de mutaciones en Ras (revisado en Schubbert *et al.* 2007). Por ello, tanto ERK1/2 como sus moduladores se mantienen bajo una estricta regulación positiva y negativa.

Uno de los activadores de esta ruta de MAPK es FGF (*Fibroblast Growth Factor*). En los últimos años han surgido varios estudios que están poniendo de manifiesto la

importancia de las rutas de señalización mediadas por FGF en la patogénesis del sarcoma de Ewing. Por ejemplo, se ha visto que FGFb (*basic Fibroblast Growth Factor*) aumenta la proliferación de las células de Ewing *in vitro* y que *EGR2*, un componente *downstream* de la ruta de FGF, es un gen inducido por EWS-FLI1 (Grunewald *et al.* 2015). En otros estudios se ha demostrado que FGFb regula la movilidad e invasividad de las células de Ewing en el microentorno óseo (Kamura *et al.* 2010) y que la delección constitutiva de *FGFR1* inhibe la implantación de xenotransplantes de sarcoma de Ewing en ratones (Agelopoulos *et al.* 2015). Finalmente, cerca del 75% de las biopsias de sarcoma de Ewing presentan niveles de fosforilación de FGFR1 moderados o altos (Kamura *et al.* 2010), a pesar de que las mutaciones activadoras de FGFR1 son muy infrecuentes en esta enfermedad (Agelopoulos *et al.* 2015). Estos estudios indican que la ruta del FGF puede ser una de las rutas de RTKs más relevantes en sarcoma de Ewing.

Uno de los reguladores negativos fundamentales de la señalización mediada por FGF es la familia de proteínas *Sprouty* (SPRY) (Masoumi-Moghaddam *et al.* 2014b) (**Figura 2**). La unión de FGF a su receptor genera una activación de la familia de quinasas Src, que a su vez activan a SPRY por fosforilación (Mason *et al.* 2004). Una vez activado, SPRY secuestra a la molécula adaptadora Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), que interacciona con SOS (*Son of Sevenless*). SOS es un factor encargado del intercambio GDP-GTP en Ras, generando así la transducción de la señalización de los receptores RTK hacia la activación de la ruta MAPK (Casci *et al.* 1999, Gross *et al.* 2001, Hanafusa *et al.* 2002). Dado que la activación de Ras es esencial para la señalización por MAPK, al interrumpir la señalización de RTKs a nivel de la activación de Ras, SPRY actúa como un inhibidor de la ruta de MAPK.

La relación entre SPRY1 y la activación de esta ruta de MAPK por FGF en mamíferos ha sido descrita en varios estudios donde se ha visto, por ejemplo, que durante la organogénesis SPRY1 y -2 antagonizan la señalización por FGF durante el desarrollo embrionario del oído limitando su crecimiento (Mahoney Rogers *et al.* 2011). Además, SPRY1 está implicado en el control de la proliferación y la diferenciación celular en cáncer. Por ejemplo, en cáncer de próstata, donde hay una sobreexpresión de FGF, se cree que los bajos niveles de SPRY1 favorecen una traducción descontrolada de la señal de este factor de crecimiento, fomentando así la progresión tumoral (Kwabi-Addo *et al.*

2004). En muestras clínicas de mama se ha observado que en tejido sano SPRY1 y FGF8 mantienen sus niveles de expresión y que en el tejido tumoral cercano, la expresión de FGF8 incrementa mientras que la de SPRY1 baja drásticamente (Lo *et al.* 2004). Es interesante mencionar también que durante la embriogénesis su expresión coincide espacialmente con la de los centros de señalización de FGF (de Maximy *et al.* 1999, Minowada *et al.* 1999, Chambers and Mason 2000), lo que vuelve a poner de manifiesto la relación entre las proteínas SPRY y las rutas de señalización dependientes de FGF.

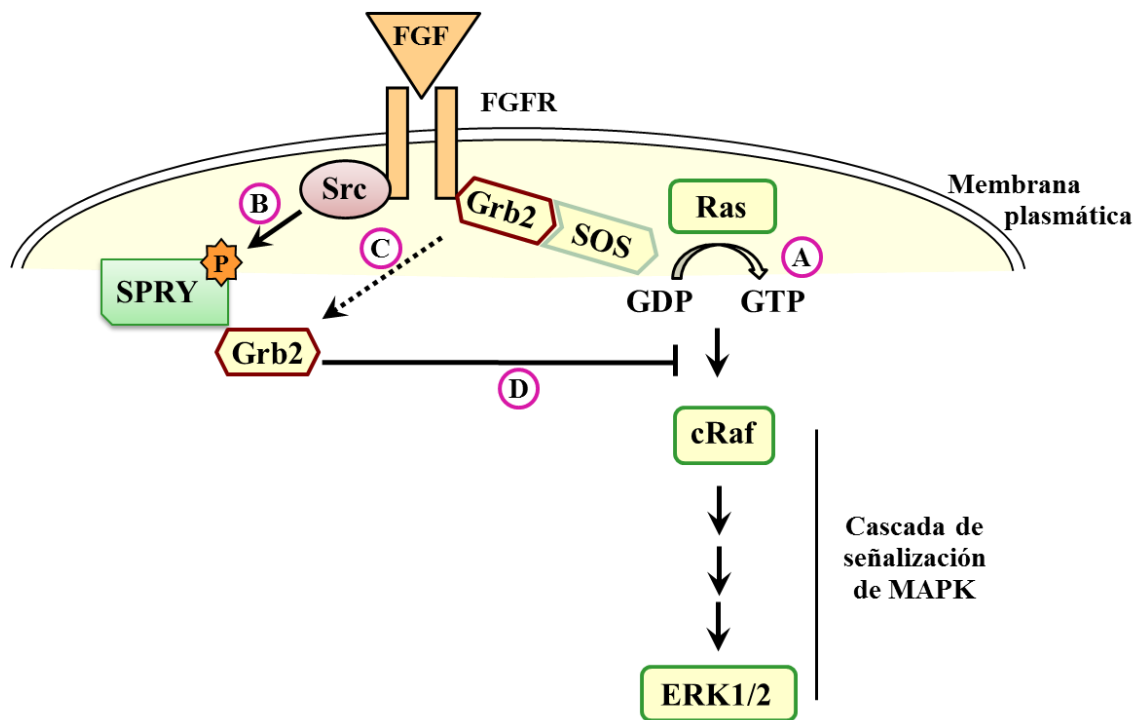


Figura 2. Regulación negativa de la ruta de señalización Ras/MAPK/ERK inducida por FGF mediante SPRY1. (A) La activación del receptor de tirosina quinasa (FGFR) por su ligando (FGF) da lugar a la activación de Grb2 por fosforilación que permite el acoplamiento de SOS. SOS convierte Ras-GDP en Ras-GTP, generando la consiguiente activación de la cascada de MAPK. (B) Por otro lado, la activación de FGFR también genera la activación Src, que a su vez activa SPRY1 por fosforilación (P). (C) SPRY1 activado secuestra Grb lo que produce (D) la inhibición de la cascada de señalización de la ruta de MAPK activada por FGF. Modificado de Assinder *et al.* (Assinder *et al.* 2015).

Se puede concluir entonces que existe una relación importante entre SPRY1 y FGF y que esta podría ser relevante en la patogénesis del sarcoma de Ewing.

A continuación vamos a describir en detalle las características de la proteína SPRY1, así como sus funciones fisiológicas y su rol en cáncer.

1.5. *Sprouty 1 (SPRY1)*

1.5.1. Características moleculares de SPRY1 y otros miembros de la familia de proteínas *Sprouty*.

El primer miembro de la familia de proteínas *Sprouty* se descubrió en 1998 mientras se realizaba una búsqueda de los genes implicados en el desarrollo y la formación de la tráquea durante la fase embrionaria en *Drosophila* (Hacohen *et al.* 1998), observándose que las moscas deficientes en dSpry presentaban excesivas ramificaciones de la tráquea, de ahí el nombre. Posteriormente se demostró que se trataba de una proteína intracelular asociada a membrana que actuaba como un inhibidor de la ruta de señalización RTK/Ras/ERK *downstream* de varios factores de crecimiento como FGF y EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Casci *et al.* 1999).

En mamíferos, la familia de proteínas *Sprouty* está compuesta por 4 miembros (SPRY1-4) que comparten varias regiones conservadas (Minowada *et al.* 1999): un dominio rico en cisteínas muy conservado (CRD, *cysteine-rich domain*) de aproximadamente 110 residuos, que contiene 22 cisteínas en la región C-terminal; un motivo de unión a tirosina quinasa (TKB, *tyrosine kinase-binding*) de c-Cbl (*canonical Casitas B-lineage lymphoma*) en torno a una tirosina (Y53 en SPRY1, Y55 en SPRY2, Y27 en SPRY3 y Y53 en SPRY4); y un dominio rico en serinas (SRM, *serine-rich motif*) en la región N-terminal (Guy *et al.* 2009) (**Figura 3**). El dominio rico en cisteínas también está presente en otra familia de proteínas llamadas SPRED (*Sprouty-related proteins with an EVH-1 domain*), que en mamíferos está formada por 4 miembros (SPRED1-3 y EVE-3) y que también actúan como inhibidores de la fosforilación de ERK mediada por FGF o NGF (*nerve growth factor*) (Wakioka *et al.* 2001). La función del dominio CDR es mediar la homo y heterodimerización entre los miembros de la familia (Ozaki *et al.* 2005) y favorecer la localización de las proteínas en la membrana, influenciando así su función (Casci *et al.* 1999, Lim *et al.* 2000). De hecho, se ha observado que si bien las proteínas no dimerizadas son capaces de inhibir la ruta Ras/MAPK/ERK, el efecto inhibitorio es aún mayor cuando las proteínas forman heterodímeros (y en menor medida homodímeros) (Ozaki *et al.* 2005). En cuanto a la tirosina del dominio de activación, se sabe que su actividad depende de la fosforilación mediada por la tirosina quinasa Src (*Stored response chain*) y que esta fosforilación es necesaria para inhibir la señalización a través de la ruta Ras/MAPK/ERK (Li *et al.* 2004). Finalmente, el

dominio rico en serinas forma una “bisagra” implicada en el mantenimiento de la estructura tridimensional de las proteínas de la familia Sprouty (Guy *et al.* 2009).

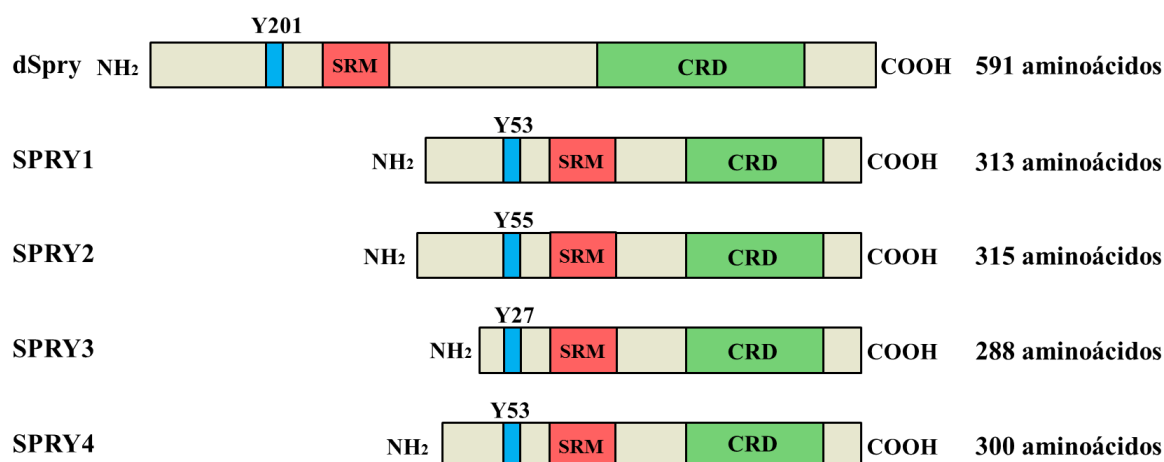


Figura 3. Estructura de la familia de proteínas Sprouty en *Drosophila* y en mamíferos. Se muestra una representación esquemática de los dominios conservados en la familia de proteínas Sprouty incluida la tirosina (Y), que se fosforila por Src en respuesta a factores de crecimiento y el motivo rico en serinas (SRM; *serine-rich motif*) conservados en el N-terminal. En la región C-terminal se muestra el dominio conservado rico en cisteínas (CRD; *cysteine-rich domain*). Se indica también el tamaño en aminoácidos de cada una de las proteínas.

Los diferentes miembros de la familia difieren en su distribución tisular y en las proteínas con las que interaccionan, como c-Cbl, Grb2, Raf1, FRS2, caveolina-1, TESK1 y PTP1B (Christofori 2003).

1.5.2. SPRY1: funciones fisiológicas

Las proteínas *Sprouty* son inhibidoras de la señalización mediada por factores de crecimiento. Así, la delección de *SPRY* en modelos murinos da lugar a una serie de anomalías fenotípicas relacionadas con la hiperactivación de la señalización por RTKs, que confirman la importancia de estas proteínas durante la organogénesis. De este modo, la delección de *SPRY1* genera defectos en el tracto urinario y un aumento de la activación de ERK (Basson *et al.* 2005, Basson *et al.* 2006), la delección de *SPRY2* provoca alteraciones en el desarrollo del oído interno (Shim *et al.* 2005) y la delección de *SPRY4* genera un retraso en el crecimiento y polisindactilia (Taniguchi *et al.* 2007). Asimismo, en otros estudios se ha descrito que SPRY2 y -4 están relacionados con la

formación de diastemas debido a la inhibición de la señalización de FGF (Klein *et al.* 2006). Por otro lado, las proteínas de la familia *Sprouty* también regulan negativamente la señalización mediada por interferón (IFN) y se ha descrito que al inhibir su expresión se genera un aumento del efecto antileucémico dependiente de IFN tipo I (Sharma *et al.* 2012).

Además de los estudios realizados en ratones *knock-out* para *SPRY1* mencionados anteriormente, existen otros muchos sistemas en los que se ha descrito su actividad. *SPRY1* y *-2* tienen roles importantes en la diferenciación temprana de varios órganos: regulan la diferenciación cortical en el cerebro mediante la inhibición de la señalización FGF/MAPK/ERK (Faedo *et al.* 2010), la diferenciación de la córnea, el cierre del párpado del ojo (Kuracha *et al.* 2011, Kuracha *et al.* 2013), el desarrollo de los genitales externos (Ching *et al.* 2014) y de la articulación temporomandibular (Purcell *et al.* 2012). Además, son reguladores negativos de TGF β (*Transforming Growth Factor β*) en el contexto de la transición epitelio-mesénquima, y su ausencia genera la formación de fibrosis en enfermedades como las cataratas (Shin *et al.* 2012). Se ha descrito que *SPRY1* y *-4* tienen efectos antagónicos en las células de músculo liso vascular, siendo *SPRY1* el que mantiene el fenotipo diferenciado regulando la ruta AKT/FOXO/Miocardina (Yang *et al.* 2013).

En el contexto hematopoyético, *SPRY1* actúa favoreciendo la diferenciación osteoblástica de progenitores hematopoyéticos en detrimento de la formación de adipocitos (Urs *et al.* 2010), de modo que la expresión específica de *SPRY1* en adipocitos reduce la grasa corporal y aumenta la masa ósea, generando un efecto protector sobre ratones alimentados con dietas altas en grasas (Urs *et al.* 2010, Urs *et al.* 2012). *SPRY1* también ha demostrado ser un regulador de la eritropoyesis en modelos de anemia (Sathyanarayana *et al.* 2012).

En el sistema inmune, se ha descrito que el efecto de *SPRY1* sobre la señalización por TCR (*T cell receptor*) de células T depende de su estado de diferenciación. Así, *SPRY1* inhibe la señalización mediada por TCR y la proliferación en células diferenciadas, mientras que en células T *naïve* presenta el efecto opuesto (Choi *et al.* 2006). *SPRY1* regula también la respuesta efectora de células T CD4⁺ y CD8⁺ dotándolas de una mayor actividad antitumoral (Collins *et al.* 2012).

Además, SPRY1 participa en la reparación tisular regulando el estado de quiescencia de células madre musculares adultas durante el proceso de regeneración (Shea *et al.* 2010) y la hipermetilación del promotor de SPRY1 debido al envejecimiento se ha propuesto como una de las causas de la disminución de la capacidad de regeneración tisular asociadas a la edad (Bigot *et al.* 2015). Finalmente, SPRY1 tiene un efecto inhibitor de la angiogénesis y de la proliferación celular en células endoteliales (Lee *et al.* 2010, Sabatel *et al.* 2010).

En la **Tabla 2** se resumen las funciones fisiológicas de la proteína SPRY1 que acabamos de describir.

Tabla 2. Funciones fisiológicas de la proteína SPRY1.

Organogénesis y diferenciación	Referencias
Regula la diferenciación cortical del cerebro mediante la represión de la señalización de FGF.	Faedo <i>et al.</i> 2010
Favorece la diferenciación de la córnea e inhibe la proliferación de las células epiteliales de la córnea.	Kuracha <i>et al.</i> 2011
Permite el desarrollo de la estructura para el cierre del párpado en el ojo.	Kuracha <i>et al.</i> 2013
Participa en el desarrollo de los genitales externos mediante la regulación de la señalización de FGF.	Ching <i>et al.</i> 2014
SPRY1 es una diana de WT1, un factor de transcripción implicado en el desarrollo del riñón y es necesario para la correcta organogénesis.	Gross <i>et al.</i> 2003
SPRY1 es necesario para la regulación de la señalización de FGF y el correcto desarrollo de la articulación temporomandibular.	Purcell <i>et al.</i> 2012
SPRY1 regula la transición epitelio-mesénquima mediante la inhibición de TGF β .	Shin <i>et al.</i> 2012
Mantenimiento de la diferenciación en músculo liso vascular.	Yang <i>et al.</i> 2013
SPRY1 favorece la diferenciación osteoblástica de precursores hematopoyéticos.	Urs <i>et al.</i> 2010
Regulación de células T	Referencias
Inhibición de la señalización TCR y la proliferación en células T diferenciadas.	Choi <i>et al.</i> 2006
SPRY1 favorece la señalización TCR en células T <i>naïve</i> .	Choi <i>et al.</i> 2006
Regulación respuesta efectora de células T CD4+ y CD8+.	Collins <i>et al.</i> 2012
Regeneración y proliferación celular	Referencias
Regulación de la quiescencia en células madre musculares adultas durante la regeneración tisular.	Shea <i>et al.</i> 2010, Bigot <i>et al.</i> 2015
Inhibición de la angiogénesis y proliferación celular en células endoteliales por regulación de p21 y p27.	Lee <i>et al.</i> 2010, Sabatel <i>et al.</i> 2010

1.5.3. SPRY1 en cáncer

Dado que SPRY1 es un regulador negativo de la señalización mediada por Ras y que aproximadamente un tercio de los cánceres en humanos presentan mutaciones activadoras en Ras (Zhao *et al.* 2010), se ha sugerido que SPRY1 podría actuar como un supresor tumoral. Además, varios estudios han puesto de manifiesto que SPRY1 se expresa a niveles bajos en diferentes tipos de cáncer, como el cáncer de mama, ovario o próstata (Lo *et al.* 2004, Fritzsche *et al.* 2006, Kwabi-Addo *et al.* 2009, Moghaddam *et al.* 2012). Por otro lado, la sobreexpresión de SPRY1 en células tumorales inhibe sus características tumorigénicas como la proliferación, la migración y el crecimiento independiente de anclaje *in vitro* en cáncer de próstata, cáncer de mama, de ovario, melanoma y en células de carcinoma medular de tiroides (Kwabi-Addo *et al.* 2004, Lo *et al.* 2004, Macia *et al.* 2012, Masoumi-Moghaddam *et al.* 2014a, Liu *et al.* 2015). Por último, se ha descrito que SPRY1 es además, diana de varios supresores de tumores conocidos, como WT1 (Gross *et al.* 2003), el agente angiostático prolactina 16K (Sabatel *et al.* 2010) y miR-21 (Xu *et al.* 2014).

Debido a la relación entre los niveles altos de expresión de SPRY1 y la inhibición de la tumorigenicidad en diferentes tipos de cáncer, se ha valorado la posibilidad de emplear los niveles de expresión de SPRY1 como factor pronóstico en varios tipos de cáncer. Por ejemplo, la expresión de SPRY1 es superior en los casos de cáncer hepático sin cirrosis en comparación con los casos que sí la presentan (Sirivatanauksorn *et al.* 2012). En cáncer de mama, la expresión de SPRY1 se reduce drásticamente en las células tumorales en relación al tejido epitelial normal circundante (Lo *et al.* 2004). En cáncer de ovario, la expresión de SPRY1 correlaciona negativamente con características de malignidad (estadio del tumor, recaída, invasión linfovascular) y la expresión de ERK y Ki-67 y positivamente con mejores valores de supervivencia global (Masoumi-Moghaddam *et al.* 2015). En cáncer de tiroides, la expresión de SPRY1 es más baja en tejido tumoral que en el tejido normal (Macia *et al.* 2014). Por último, en cáncer de próstata, donde las alteraciones en FGF o FGFR contribuyen a la progresión de la enfermedad, se han descrito niveles más bajos de SPRY1 en el 40% de los tumores con respecto al tejido normal (Kwabi-Addo *et al.* 2004) y niveles de SPRY1 incluso más bajo en los casos de pacientes con recaídas (Fritzsche *et al.* 2006, Terada *et al.* 2014).

En la **Tabla 3** se muestra un resumen de las funciones de SPRY1 en cáncer descritas hasta el momento.

Tabla 3. Funciones de la proteína SPRY1 en cáncer.

Cáncer de próstata	Referencias
La re-expresión de SPRY1 inhibe la proliferación de células de cáncer de próstata <i>in vitro</i> .	Kwabi-Addo <i>et al.</i> 2009
Bajos niveles de expresión de SPRY1 en cáncer de próstata.	Fritzsche <i>et al.</i> 2006
Cáncer de ovario	Referencias
La expresión de SPRY1 correlaciona inversamente con el crecimiento, la proliferación y la migración de células de cáncer de ovario.	Masoumi-Moghaddam <i>et al.</i> 2014a
Niveles bajos de expresión de SPRY1 en tumores de ovario.	Moghaddam <i>et al.</i> 2012
Cáncer de mama	Referencias
La inhibición de SPRY1 en células de cáncer de mama genera un fenotipo tumoral más acusado <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	Lo <i>et al.</i> 2004
Niveles bajos de expresión de SPRY1 en tumores de mama.	Lo <i>et al.</i> 2004
Melanoma	Referencias
La re-expresión de SPRY1 inhibe la proliferación de células de melanoma <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	Liu <i>et al.</i> 2015
Cáncer de tiroides	Referencias
La delección de SPRY1 genera lesiones precancerosas en un modelo murino de carcinoma medular de tiroides. La re-expresión de SPRY1 inhibe la proliferación de las células tumorales.	Macia <i>et al.</i> 2012

En resumen, varios estudios indican que hay una asociación entre la baja expresión de SPRY1 con las características tumorigénicas en varios tipos de cáncer; y viceversa, una alta expresión de SPRY1 se correlaciona con mejores pronósticos en diversas neoplasias. Es por ello que SPRY1 constituye una diana de estudio muy interesante en otros tipos de cáncer como el sarcoma de Ewing.

2. Objetivos

El sarcoma de Ewing se caracteriza por la presencia de translocaciones cromosómicas que dan lugar a un factor de transcripción quimérico, el más frecuente de los cuales es EWS-FLI1. EWS-FLI1 regula la expresión de numerosos genes implicados en la patogénesis de este tumor. Por ello es importante estudiar los genes regulados por EWS-FLI1 para ampliar así nuestro conocimiento sobre la biología de los tumores de Ewing e identificar nuevas dianas terapéuticas.

Esta Tesis está centrada en el estudio de *SPRY1*, un gen que regula la actividad de la ruta de las MAPK y que actúa como un gen supresor de tumores en varios tipos de cáncer. El papel de este gen en el sarcoma de Ewing no ha sido estudiado hasta el momento.

Los objetivos concretos planteados en esta Tesis son:

1) Caracterizar el perfil de expresión de SPRY1 en células y tumores de sarcoma de Ewing y su regulación por EWS-FLI1.

Para ello se emplearán sistemas de ARN de interferencia inducible contra EWS-FLI1 en células de Ewing y se analizará el efecto del silenciamiento de EWS-FLI1 sobre la expresión de *SPRY1*. También se analizará la expresión de *SPRY1* en tumores primarios y líneas celulares derivadas de sarcoma de Ewing, tejidos normales y líneas celulares procedentes de otros tumores pediátricos.

2) Estudiar el papel funcional de SPRY1 en el desarrollo de los tumores de Ewing.

Para ello se establecerán modelos de expresión inducible de *SPRY1* en líneas celulares de sarcoma de Ewing y se estudiará el efecto de su expresión sobre las características transformantes y tumorigénicas de estas células.

3) Estudiar el efecto de SPRY1 sobre la ruta de señalización FGFR/Ras/MAPK/ERK en sarcoma de Ewing.

Para ello se analizará el efecto de la re-expresión de SPRY1 sobre la ruta de señalización de FGFR/Ras/MAPK/ERK en líneas celulares de sarcoma de Ewing.

4) Valorar la utilidad de los inhibidores de los receptores de FGF en el tratamiento del sarcoma de Ewing.

Se estudiará el efecto de diferentes inhibidores de FGFR sobre las células de sarcoma de Ewing y sobre modelos de xenotransplantes murinos, así como el posible efecto sinérgico entre SPRY1 y los inhibidores de FGFR.

5) Estudiar el posible papel pronóstico de SPRY1 en sarcoma de Ewing.

Para ello se analizarán los niveles de expresión de SPRY1 en relación con la supervivencia global, la supervivencia libre de eventos y la presencia de metástasis al diagnóstico en una cohorte grande de pacientes.

3. Materiales y Métodos

3.1. Material biológico

3.1.1. Líneas celulares

En las **Tablas 4 y 5** se enumeran las líneas celulares utilizadas en la realización de esta Tesis así como sus características más relevantes y el medio de cultivo utilizado en cada una.

El medio de cultivo se suplementó con suero fetal bovino (SFB) (10-20% según la línea celular), o con suero fetal bovino sin tetraciclina (SFB-TET) en el caso de las líneas celulares con los sistemas de expresión inducibles por tetraciclina. Todos los medios de cultivo fueron suplementados con penicilina (100 UI/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Las líneas celulares se cultivaron a 37 °C en atmósfera al 5% de CO₂ y 95% de humedad. Todas las líneas celulares se testaron de forma rutinaria para detectar contaminaciones de micoplasma utilizando el kit comercial *Mycoalert mycoplasma detection kit* (#LT07-318, Lonza, Basilea, Suiza) y se autentificaron por análisis del perfil de STRs (*short tandem repeats*) en la Unidad de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas-CSIC (Madrid, España).

3.1.2. Cohortes de pacientes y tumores primarios

En esta Tesis se han utilizado datos procedentes de dos cohortes de pacientes. En ambas cohortes se analizaron las muestras tumorales con *arrays* de expresión y se obtuvieron los datos clínicos. Los protocolos de tratamiento en ambas cohortes fueron similares. La primera cohorte está formada por 117 pacientes analizados con *microarrays* HG-U133 plus2.0 (Affymetrix, California, EEUU) y ha sido previamente publicada (Postel-Vinay *et al.* 2012). La segunda cohorte está formada por 45 pacientes cuyos tumores se habían analizado previamente en nuestro laboratorio utilizando un *microarray* *Uniset Human 20K* (Codelink Amersham Bioscience, GE Healthcare, Reino Unido). Todos los procedimientos fueron aprobados por los comités de ética de las instituciones correspondientes.

Para los estudios de expresión por RT-PCR cuantitativa se utilizó una selección de muestras tumorales de pacientes que presentaban diferentes tipos de fusión EWS-FLI1.

Tabla 4. Lista de líneas celulares utilizadas

Línea Celular	Tipo celular*	Características**	Medio de cultivo	Referencia
A673	SE	t(11;22); EWS-FLI1 tipo I	DMEM	Frolik <i>et al.</i> 1984, Dauphinot <i>et al.</i> 2001
SKES	SE	t(11;22); EWS-FLI1 tipo II	DMEM	Giovanini <i>et al.</i> 1994, Dauphinot <i>et al.</i> 2001
SKNMC	SE	t(11;22); EWS-FLI1 tipo I	IMDM	Bastida <i>et al.</i> 1985
SKPNDW	SE	t(11;22); EWS-FLI1 tipo I	IMDM	Potluri <i>et al.</i> 1987
TC-71	SE	t(11;22); EWS-FLI1 tipo I	IMDM	Whang-Peng <i>et al.</i> 1984
A4573	SE	t(11;22); EWS-FLI1 10/6	RPMI	Cavazzana <i>et al.</i> 1987
RDES	SE	t(11;22); EWS-FLI1 tipo II	RPMI	Giovanini <i>et al.</i> 1994, Dauphinot <i>et al.</i> 2001
TTC466	SE	t(21;22); EWS-ERG tipo I	RPMI	Sorensen <i>et al.</i> 1994
POE	SE	t(11;22); EWS-FLI1 tipo I	RPMI	Generadas en el Instituto Curie, París, Francia
U2OS	OS	pRb+, p53+	RPMI	Ponten and Saksela 1967
SAOS-2	OS	pRb-, p53-	RPMI	Fogh <i>et al.</i> 1977
SH-SH5Y	NB	NMA-	DMEM	Biedler <i>et al.</i> 1978
IMR-32	NB	1p-, NMA+	RPMI	Tumilowicz <i>et al.</i> 1970, Brodeur <i>et al.</i> 1977
SK-N-SH	NB	1p-, 1q+	RPMI	Brodeur <i>et al.</i> 1977, Seeger <i>et al.</i> 1977
CW9019	RMS	t(1;13) PAX7/FKHR	RPMI	Edwards <i>et al.</i> 1997
SK-N-AS	NB	1p-	RPMI	Sugimoto <i>et al.</i> 1984
293 FT	HEK	Células transformadas con adenovirus 5	DMEM	Invitrogen
IMR90	FB	p53-	DMEM	Nichols <i>et al.</i> 1977

Tabla 5. Lista de líneas celulares modificadas genéticamente utilizadas

Línea Celular Modificada Genéticamente	Tipo celular*	Características**	Medio de cultivo	Referencia
A673/TR	SE	t(11;22); EWS-FLI1 tipo I. Expresan el represor de tetraciclina (TR) de forma constitutiva	DMEM + 3 µg/ml blasticidina	Carrillo <i>et al.</i> 2007
SKES/TR	SE	t(11;22); EWS-FLI1 tipo II. Expresan el represor de tetraciclina (TR) de forma constitutiva	DMEM + 3 µg/ml blasticidina	Carrillo <i>et al.</i> 2007
SKNMC/TR	SE	t(11;22); EWS-FLI1 tipo I. Expresan el represor de tetraciclina (TR) de forma constitutiva	IMDM + 3 µg/ml blasticidina	Carrillo <i>et al.</i> 2007
A673/TR/shEF	SE	t(11;22); EWS-FLI1 tipo I. Estas células expresan un shARN dirigido contra EWS-FLI1 cuando se estimulan con doxíciclina.	DMEM + 100 µg/ml zeocina + 3 µg/ml blasticidina	Carrillo <i>et al.</i> 2007
A673/TR/SPRY1	SE	t(11;22); EWS-FLI1 tipo I. Estas células re-expresan el cDNA de SPRY1 en respuesta a estimulación con doxíciclina.	DMEM + 100 µg/ml zeocina + 3 µg/ml blasticidina	Esta Tesis y Cidre-Aranaz <i>et al.</i> 2016
SKES/TR/SPRY1	SE	t(11;22); EWS-FLI1 tipo II. Estas células re-expresan el cDNA de SPRY1 en respuesta a estimulación con doxíciclina.	DMEM + 100 µg/ml zeocina + 3 µg/ml blasticidina	Esta Tesis y Cidre-Aranaz <i>et al.</i> 2016
SKNMC/TR/SPRY1	SE	t(11;22); EWS-FLI1 tipo I. Estas células re-expresan el cDNA de SPRY1 en respuesta a estimulación con doxíciclina.	DMEM + 100 µg/ml zeocina + 3 µg/ml blasticidina	Esta Tesis y Cidre-Aranaz <i>et al.</i> 2016

*SE: Sarcoma de Ewing; NB: Neuroblastoma; OS: Osteosarcoma; FB: Fibroblasto; RMS: Rabdomiosarcoma; HEK: *Human Embryonic Kidney*.

**Se indican algunas de las características moleculares más relevantes de las líneas celulares empleadas, como el tipo de translocación y de proteína quimérica en las líneas de sarcoma de Ewing, la existencia de amplificación (NMA+) del oncogén *N-myc* en las líneas de neuroblastoma, así como el estatus funcional del gen *pBb* y *p53*. En las líneas celulares modificadas genéticamente se incluye la adición del sistema represor de tetraciclina (TR) que controla la expresión de las construcciones añadidas a continuación mediante la adición de doxíciclina al medio de cultivo.

3.2. Plásmidos

En la **Tabla 6** se muestran los plásmidos utilizados para la realización de esta Tesis, así como sus principales características.

Tabla 6. Plásmidos empleados y sus características.

Plásmido	Características	Casa comercial
pENTR2B	Plásmido de entrada del ADNc del gen de interés que permite la recombinación posterior con un plásmido lentiviral de destino.	Invitrogen
pLenti4/TO/V5-DEST	Plásmido lentiviral de destino, que permite la expresión regulada del gen de interés en respuesta a doxíciclina.	Invitrogen

3.3. Establecimiento de líneas celulares de sarcoma de Ewing con expresión inducible de SPRY1

El primer paso para obtener las líneas celulares de sarcoma de Ewing (A673, SKES y SKNMC) con un sistema de re-expresión inducible de SPRY1 por doxíciclina, un análogo de la tetraciclina, fue el clonaje del ADNc de SPRY1 en el vector de expresión lentiviral pLenti4/TO/V5-DEST. Para ello se amplificó la región codificante completa de *SPRY1* mediante RT-PCR utilizando ARN total procedente de células A673/TR/shEF tratadas durante 72 horas con doxíciclina (1 µg/ml) que expresan niveles elevados de SPRY1. Los cebadores utilizados (**Tabla 7**) contienen las dianas de restricción *Sall* y *NotI* que se emplearon posteriormente para realizar el clonaje.

Tabla 7. Cebadores para SPRY1 y localización de las dianas de restricción.

Cebador	Secuencia
SPRY1 F	5'-GCGGTCGACGAGATCACTACACATGGATCC-3' <i>Sall</i>
SPRY1 R	5'-CGGCGGCCGCTCATCATCATGATGGTTTACCCTGACC-3' <i>NotI</i>

Los productos de PCR se digirieron con las enzimas de restricción *Sall* y *NotI* y se clonaron en el plásmido de entrada pENTR2B (Invitrogen, Massachusetts, EEUU). Una vez confirmada la identidad de la secuencia mediante secuenciación, el ADNc de SPRY1 se transfirió por recombinación al vector lentiviral pLenti4/TO/V5-DEST (Invitrogen) inducible por doxiciclina, obteniéndose el plásmido pLenti4/TO/V5-DEST-SPRY1 que se utilizó a continuación para la generación de lentivirus.

Para producir los lentivirus se transfectaron células 293FT (Invitrogen) con pLenti4/TO/V5-DEST-SPRY1. Para la transfección, se preparó una mezcla compuesta por 12 µl de plásmidos empaquetadores (*ViraPower Packaging Mix*, Invitrogen) y 4 µg del vector que contenía el ADNc de SPRY1, diluidos en 2 ml de medio de cultivo OptiMEM I sin suero. En otro tubo, se añadieron 46 µl de lipofectamina 2000 a 2 ml de medio OptiMEM I sin suero. Después de incubar 5 minutos a temperatura ambiente, se mezclaron ambas soluciones añadiendo el ADN sobre la mezcla de lipofectamina y se incubaron 20 minutos más a temperatura ambiente para que se formasen los complejos ADN-lipofectamina 2000.

Una vez formados los complejos, la solución con los complejos ADN-lipofectamina 2000 (4 ml) se añadió a 8 millones de células 293FT en 6,5 ml de medio OptiMEM con suero en un frasco T75. Después de 24 horas, las células 293FT transfectadas se incubaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero, sodio-piruvato y 0,1% de aminoácidos no esenciales para incrementar la producción de lentivirus. A las 48 horas se recogió el sobrenadante con los virus, se clarificó a través de un filtro de 0,45 µm, se alicuotó y se congeló rápidamente en nieve carbónica, conservándose a -80 °C hasta su utilización.

Para la obtención de células de sarcoma de Ewing que expresaran SPRY1 en respuesta a doxiciclina se infectaron las células A673/TR, SKES/TR y SKNMC/TR, que expresaban altos niveles del represor de tetraciclina (TR) de forma constitutiva, con lentivirus que contenían el vector pLenti4/TO/V5-DEST-SPRY1. Las células control se infectaron con lentivirus que contenían el vector vacío (*Empty*). Para la infección se sembraron células A673/TR, SKES/TR y SKPNDW/TR a 150.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Tras 48 horas se incubaron con 1 ml de sobrenadante viral en presencia de 1 µg/ml de polibreno (#AL-118, Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU) durante

24 horas. Al día siguiente se cambió el medio por DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino libre de tetraciclina. A las 48 horas se cambió nuevamente el medio por DMEM suplementado con suero y blasticidina (5 µg/ml, resistencia asociada al pLenti6/TR) y zeocina (100 µg/ml, resistencia asociada al vector pLenti4/TO/V5-DEST-SPRY1 o pLenti4/TO/V5-DEST-Empty). Una vez obtenidos los cultivos policlonales resistentes, se aislaron 20-25 clones por cada línea celular. Cada uno de los clones estables se estimularon con doxiciclina (1 µg/ml, Ibian Technologies, Zaragoza, España) y se analizaron los niveles de expresión de SPRY1 por western blot. Los clones con niveles más altos de expresión de SPRY1 se seleccionaron para ser utilizados en los estudios posteriores. Todas las manipulaciones con lentivirus se llevaron a cabo en las instalaciones de nivel de bioseguridad 2 (P2), exclusivamente por personal autorizado.

3.4. Estudios de expresión

3.4.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN total de células en cultivo se realizó mediante el método de fenol-cloroformo empleando el reactivo TRI Reagent (Sigma-Aldrich) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido se cuantificó empleando un sistema Nanodrop (Thermo Scientific, Massachusetts, EEUU) y se conservó a -80 °C hasta su utilización.

3.4.2. RT-PCR cuantitativa a tiempo real

La retrotranscripción del ARN a ADNc se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl donde se incluyó 1 µg de ARN, 1 mM dNTPs, 10 mM DTT, 2,5 µM de cebadores hexámeros (Promega, Wisconsin, EEUU) y tampón de transcripción reversa 1x. La reacción se incubó 10 minutos a 70 °C para desnaturalizar el ARN y se enfrió en hielo. Posteriormente se añadieron 2 U/µl de inhibidor de ribonucleasas (RNasin, Promega) y 10 U/µl de transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen). La mezcla se incubó 10 minutos a 25 °C, 30 minutos a 42 °C, y finalmente 5 minutos a 95 °C. Como controles negativos se incluyeron muestras sin la enzima transcriptasa reversa.

La PCR cuantitativa con sondas Taqman se realizó en un volumen final de 20 μ l donde se incluyeron 800 μ M dNTPs, 4 mM $MgCl_2$, 1 μ l de solución cebadores/sonda Taqman (20x) (Applied Biosystems, California, EEUU), 0,5 U Taq polimerasa (Biotools, Madrid, España) y tampón de reacción 1x. El programa de PCR tuvo los siguientes pasos:

1	96 °C	120 segundos
40 ciclos	96 °C	15 segundos
	60 °C	30 segundos

Se emplearon los canales verde (FAM, para el gen de interés) y amarillo (HEX, para la TBP) y la adquisición se realizó a 510 nm y 555 nm respectivamente a 60 °C en un equipo *Rotor Gene 6000* (Corbett, Qiagen, Venlo, Holanda). El análisis de los resultados se realizó empleando el programa *RotorGene versión 6.0* (Qiagen).

En todos los ensayos se amplificó en paralelo el ARN mensajero del gen TBP (*TATA binding protein*), que se utilizó como control de referencia interno para la normalización de los niveles de expresión de los genes de interés.

La secuencia de los cebadores y sondas Taqman empleados se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Cebadores y sondas empleadas en la técnica de RT-PCR cuantitativa mediante sondas Taqman

Gen	Cebadores-sonda Taqman
TBP	Sonda Taqman 5' - HEX-CTGCCACCTTACGCTCAGGGCTTGG-TAMRA- 3' TBP-F2 5' -GAACATCATGGATCAGAACAACAG -3' TBP-R2 5' -ATTGGTGTCTGAATAGGCTGTG -3'
EWS-FLI1	Sonda Taqman 5'-FAM-AACAGAGCAGCAGCTACGGGCAGCA-TAMRA-3' EWS-F2 5' -AGCCAAGCTCCAAGTCAATATAG- 3' FLI1-R3 5' -TCCTCTTCTGACTGAGTCATAAG- 3'
SPRY1	Sonda Taqman Hs00398096_m1 (Applied Biosystems)
SPRY2	Sonda Taqman Hs00183386_m1 (Applied Biosystems)
SPRY3	Sonda Taqman Hs00538856_m1 (Applied Biosystems)
SPRY4	Sonda Taqman Hs00540086_m1 (Applied Biosystems)

Para el estudio de las variantes transcripcionales de *SPRY1* se empleó la técnica de PCR cuantitativa con *SYBR green*. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 µl donde se incluyeron 10 µl de Quantimix Easy Kit (Biotools), que contiene la ADN polimerasa, los cuatro dNTPs, MgCl₂, buffer de reacción y *SYBR Green I* (Biotools), 0,2 µl del cebador F y R (10 µM), 7,6 µl de H₂O y 2 µl de la reacción de transcripción reversa.

El programa de PCR tuvo los siguientes pasos:

1 ciclo	95 °C	120 segundos
40 ciclos	95 °C	10 segundos
	60 °C	15 segundos
	72 °C	40 segundos
	75 °C	10 segundos
	80 °C	10 segundos

Se empleó el canal verde (FAM) y la adquisición se realizó a 510 nm a 72 y 80 °C en un equipo *Rotor Gene 6000* (Corbett). El análisis de los resultados se realizó empleando el programa *RotorGene versión 6.0*.

Las secuencias de los cebadores utilizados para las RT-PCR cuantitativas con *SYBR Green* se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Cebadores empleados en la técnica de RT-PCR cuantitativa para las variantes transcripcionales de *SPRY1* con *SYBR Green*.

Gen	Cebadores-sonda Taqman
SPRY1 VT 1F	5'- ACCTCACTCTCTTCACTCCTC - 3'
SPRY1 VT 2F	5'- GTCGCTGTTAAATGTGCCTG - 3'
SPRY1 VT 3F	5'- ATATGGTGATGGGATTGTCCG - 3'
SPRY1 VT 4F	5'- CCGCTTCGGCCTAGGAT - 3'
SPRY1 R común	5'- ACAACTAACGAAGTCCACTG - 3'
SPRY1 R ₂	5'- GCAATCTTTGCATTAGGATTTTCAGAT - 3'

Para cada gen se obtuvieron los datos de Ct (*Cycle threshold*), usando el programa *RotorGene versión 6.0*. Para comparar los niveles de expresión de un mismo gen en dos muestras diferentes se usó el método de $\Delta\Delta C_t$ (Livak *et al.* 2001). Para el análisis de

resultados el nivel de expresión de cada gen se normalizó frente al control interno (TBP).

En primer lugar se calculó el valor de ΔCt de la muestra de interés y de la muestra control usando la fórmula $\Delta Ct = Ct_{\text{gen muestra de interés}} - Ct_{\text{TBP}}$. Posteriormente se calculó el valor $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra de interés}} - \Delta Ct_{\text{muestra control}}$. El valor del cociente (veces de incremento o inhibición) entre las dos muestras se calculó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.4.3. Estudios de regulación epigenética

Para el estudio de la regulación epigenética de SPRY1 se empleó un inhibidor de la desacetilación de histonas (SAHA, también llamado Vorinostat; # S1047, Selleckchem, Texas, EEUU) y un inhibidor de ADN metiltransferasa (5-Aza-2'-deoxycytidine, abreviado "5-aza", #A3656, Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 μM . Se incubaron las células A673 en presencia o ausencia de SAHA durante 24 horas o de 5-aza durante 96 horas. Pasado ese tiempo se extrajo el ARNm y se realizó una RT-PCR cuantitativa para determinar la expresión de SPRY1.

3.4.4. Western blot

Para la extracción de proteína total, las células se lavaron con PBS 1x y se lisaron en solución RIPA (PBS 1x, 1% Igepal, 0,1% SDS, 0,5% desoxicolato sódico) suplementada con inhibidores de proteasas libres de EDTA 1x (Sigma-Aldrich), de fosfatasas (por cada mililitro de RIPA se añadieron 50 μl de pirofosfato sódico pH 7,4 0,2 M, 40 μl de ortovanadato sódico 0,1 M y 1 μl de fluoruro sódico 0,5 M) y EDTA 1 μM . El lisado se pasó varias veces por una jeringuilla de 25 G para lisar las células y se incubó en hielo durante 30 minutos. Finalmente se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para precipitar los restos celulares y el sobrenadante se alicuotó y se congeló a -20 °C.

Para calcular la concentración de las proteínas extraídas se utilizó el método del ácido bicinconínico (BCA, Pierce, Massachusetts, EEUU) utilizando una curva patrón de albúmina sérica bovina. Para cada muestra se cargaron entre 10-20 μg de proteínas en

un gel de poliacrilamida vertical al 10% (acrilamida: bisacrilamida 37,5:1) y se realizó la electroforesis a 80 V para la fase concentradora y 120 V para la fase separadora.

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Thermo Scientific) usando el método de transferencia semi-seca (*Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoresis Transfer Cell Instruction Manual*; Bio-Rad Laboratories, California, EEUU) a un amperaje constante de 3 mA por cm². Los lavados de la membrana se hicieron con tampón TTBS (Tris 20 mM, NaCl 136 mM, pH 7,5 y Tween 20 0,5%) y el bloqueo se realizó con tampón TTBS y leche desnatada al 5%.

Los anticuerpos utilizados, diluciones y casas comerciales aparecen detallados en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Relación de los anticuerpos utilizados durante la realización de esta Tesis

Anticuerpo	Características	Dilución	Referencia	Casa comercial
anti-FLI1	Anticuerpo primario policlonal	1:250	RB-9295-P	NeoMarkers
anti-SPRY1	Anticuerpo primario monoclonal	1:200	SC-100861	Santa Cruz Biotechnology
Anti-tubulina	Anticuerpo primario monoclonal	1:10000	T9026	Sigma-Aldrich
anti-fosfo-p44/42 (pERK)	Anticuerpo primario monoclonal	1:1000	9106	Cell Signaling
anti-p44/42 (ERK _{total})	Anticuerpo primario policlonal	1:1000	9102	Cell Signaling
anti-mouse IgG	Anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante	1:5000 – 1:10000	SC-2055	Santa Cruz Biotechnology
anti-rabbit IgG	Anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante	1:5000 – 1:10000	SC-2054	Santa Cruz Biotechnology

Tras las incubaciones con el anticuerpo primario y secundario, se realizaron 4 lavados de 15 minutos cada uno con TTBS 1x. Finalmente se visualizaron las proteínas utilizando el sistema ECL (Amersham, Amersham, Reino Unido) y el sistema Chemidoc XRS+ Molecular Imager (BioRad). La cuantificación de las bandas se realizó con el programa ImageLab Software (BioRad).

Las membranas fueron re-hibridadas varias veces con diferentes anticuerpos. Antes de cada hibridación se sometieron a un tratamiento con una solución compuesta por SDS 10% (p/v), β -mercaptoetanol 5 mM y Tris HCl 50 mM pH 8,8 a 65 °C durante 30 minutos en rotación con el objetivo de eliminar los anticuerpos hibridados previamente.

3.5. Estudios funcionales

3.5.1. Estudios de proliferación celular

3.5.1.1. *xCELLigence*

Para determinar el efecto de la re-expresión de SPRY1 sobre la proliferación celular se utilizó el sistema bioeléctrico xCELLigence (Roche, Basilea, Suiza) que mide periódicamente la impedancia celular, la cual es proporcional al número de células presentes en la placa de cultivo. En estos experimentos se sembraron por triplicado $3\text{--}4 \times 10^3$ células por pocillo, en una placa de 96 pocillos específica para este ensayo que incluye micro-electrodos en el fondo (e-plate, Roche). Las células se cultivaron en ausencia o presencia de doxiciclina (1 $\mu\text{g/ml}$) para inducir la expresión de SPRY1. El medio se cambió una vez a las 72 horas.

3.5.1.2. *Ensayos de proliferación celular por incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) al ADN*

La proliferación celular se midió utilizando el kit comercial *BrdU chemiluminescent assay* (Roche). La BrdU se incorpora al ADN de nueva síntesis permitiéndonos así determinar la proliferación. En estos experimentos se sembraron 10^3 células/pocillo por octuplicado en una placa de 96 pocillos en 200 μl de medio en ausencia o presencia de doxiciclina (1 $\mu\text{g/ml}$). Para determinar el efecto del suero, las células se incubaron con medio de cultivo suplementado con 10% o 1% de SFB libre de tetraciclina. Después del periodo de incubación con el estímulo, las células se incubaron con la solución de BrdU, se fijaron y se incubaron con una solución anti-BrdU-POD que tras el lavado fue incubada con el sustrato para dar la reacción que genera quimioluminiscencia. La señal se cuantificó midiendo los fotones emitidos usando una placa blanca en el luminómetro con tecnología de fotomultiplicador Infinite M200 (Tecan, Zúrich, Suiza). La relación

de unidades relativas de luz/segundo (rlu/s) correlaciona directamente con la cantidad de ADN sintetizado y, por lo tanto, con el número de células que han proliferado en el cultivo.

3.5.1.3. *Determinación de la viabilidad celular mediante reducción de resazurina*

La viabilidad celular se midió utilizando un ensayo con resazurina (Sigma-Aldrich), que es un compuesto no fluorescente que al ser reducido por las células vivas metabólicamente activas se convierte en resorufina, que emite fluorescencia roja.

En el caso de los ensayos con células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1, las células se sembraron por octuplicado a una densidad de $2,5 \times 10^3$ células por pocillo en placas de 96 pocillos y se cultivaron en presencia o ausencia de doxiciclina (1 $\mu\text{g/ml}$) o el estímulo correspondiente (SFB libre de tetraciclina a 1% o 10%, o 10 ng/ml de FGFb) durante 72 horas.

Para analizar el efecto de los inhibidores de los receptores de FGF (FGFR) se utilizaron células A673, SKNMC, SKES, POE e IMR90 cultivadas en presencia de dosis crecientes de cada uno de los inhibidores durante 72 horas. Los inhibidores empleados se detallan en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Inhibidores de FGFR empleados para la realización de esta Tesis.

Inhibidor	Características	Casa comercial	Referencia
PD173074	Inhibidor de FGFR1	Selleckchem	#S1264
PD166866	Inhibidor de FGFR1	Sigma-Aldrich	# PZ0114
SU5402	Inhibidor de FGFR1	Selleckchem	# S7667
NVP-BGJ398	Inhibidor de FGFR1, -2 y -3	Selleckchem	# S2183

Una vez finalizados los periodos de incubación correspondientes se añadió resazurina (Sigma-Aldrich) al medio de cultivo a 0,15 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó durante 2 horas a 37 °C. Finalmente se midió la fluorescencia a 560 nm de excitación y 590 nm emisión en un lector de placas Infinite M200 (Tecan).

3.5.1.4. *Análisis de las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo empleando yoduro de propidio*

Para determinar las fases del ciclo celular se llevaron a cabo experimentos de citometría de flujo con yoduro de propidio. Para ello, se sembraron las líneas celulares A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 en placas p100 y se cultivaron en presencia o ausencia de doxiciclina durante 72 horas. Pasado ese tiempo, se recogió el sobrenadante para recuperar las células en suspensión y se tripsinizaron las células adheridas, juntándose todas en el mismo tubo. Las células se lavaron dos veces con PBS 1x y se fijaron en etanol al 70% a 4 °C durante un mínimo de 2 horas.

A continuación las células se lavaron con PBS 1x, se resuspendieron en PBS 1x que contenía ribonucleasa A 100 µg/ml (#R6148, Sigma-Aldrich) y yoduro de propidio 40 µg/ml (#P4170, Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a 37 °C.

Para cada condición se analizaron 10.000 células en un citómetro MACS Quant Analyzer (Miltenyi Biotec, Colonia, Alemania). Los datos se procesaron con el programa Flowing Software (Cell Imaging Core, Turku Centre for Biotechnology, Finlandia).

3.5.1.5. *Cuantificación del crecimiento clonogénico en placa*

Para estudiar el crecimiento en placa a muy baja densidad, las células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 se sembraron por triplicado a $0,5 \times 10^3$, 10^3 y 2×10^3 células por pocillo respectivamente en placas de 24 pocillos. Posteriormente fueron cultivadas en ausencia o presencia de doxiciclina (1 µg/ml) y mantenidas en medio de cultivo suplementado con 5% de SFB libre de tetraciclina durante 9 días. Durante este tiempo el medio se cambió cada 72 horas. Para analizar el efecto de los inhibidores de FGFR sobre las células de sarcoma de Ewing y las células control (IMR90), se sembraron 3×10^3 células por pocillo por triplicado en medio con suero y se les añadió el inhibidor correspondiente durante 12-15 días, renovando el medio y el tratamiento cada 72 horas.

Al finalizar el periodo de incubación correspondiente se fijaron las colonias con paraformaldehído al 3%, se lavaron con metanol al 2% en PBS 1x y se tiñeron con cristal violeta al 0,5% en 20% de metanol. Se tomaron 10 fotografías representativas de cada pocillo. El colorante se liberó utilizando una solución de etanol al 50% y 0,1 M de citrato sódico (pH 4,2) y se cuantificó la absorbancia de la disolución resultante a 550 nm utilizando un lector de placas Infinite M200 (Tecan).

3.5.1.6. *Ensayo de crecimiento libre de anclaje en medio semisólido*

Para los experimentos de formación de focos de crecimiento independiente de anclaje se prepararon placas de 6 pocillos con una base de 2 ml de agar noble al 0,5 % (p/v) (Sigma-Aldrich) en medio DMEM/Hepes, suplementado con SFB sin tetraciclina, glutamina (4 mM), penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml), fungizona (3 µg/ml) y baycip (25 µg/ml). Una vez solidificado, se sembraron 50.000 células (A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 o SKNMC/TR/SPRY1) por pocillo resuspendidas en 0,5 ml de agar noble al 0,3% (p/v) preparado en medio de cultivo suplementado. Las células se mantuvieron a 37 °C durante 4 semanas, añadiendo medio fresco (aproximadamente 200 µl) cada 2 o 3 días (DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino libre de tetraciclina, antibióticos y doxiciclina a 1 µg/ml cuando correspondiese).

Las colonias se tiñeron con cristal violeta al 0,005 % (p/v) y se seleccionaron 3 campos de las placas aleatoriamente para tomar fotografías con aumento 4X. El número y el área de las colonias por campo se cuantificaron con el programa ImageJ (NIH, Maryland, EEUU).

3.5.2. Estudios de migración celular

3.5.2.1. *Ensayos de migración por cierre de herida*

Este ensayo se basa en la observación de la progresión de la migración celular en una monocapa confluyente de células a la que previamente se le ha realizado una “herida”. Las células en el borde de la “herida” (frente) migrarán hasta establecer nuevos contactos célula-célula, cerrando así la “herida” y permitiendo cuantificar el avance de este frente y determinar así su capacidad migratoria.

Para este ensayo, las células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 o SKNMC/TR/SPRY1 se sembraron por triplicado a una densidad de 3×10^4 células por pocillo en placas de 24 pocillos y se incubaron en ausencia o presencia de doxiciclina (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 72 horas hasta obtener un cultivo confluyente al 90% en monocapa. Tras este periodo, se utilizó la punta de una pipeta de 200 μl para efectuar una “herida” en la monocapa de células. Posteriormente se señaló en la base de la placa aleatoriamente las zonas de la “herida” destinadas a ser fotografiadas periódicamente para observar la evolución. Se realizaron fotografías cada 6 o 12 horas. La cuantificación de la migración celular relativa se realizó empleando el programa ImageJ donde cada una de las fotografías obtenidas fue convertida a imagen binaria para resaltar la diferencia entre la zona con presencia de células y la zona de la “herida”. Posteriormente se obtuvo el área de la “herida” utilizando la herramienta de dibujo de área del mismo programa.

3.5.2.2. *Ensayo de migración a través de membrana porosa*

Para estudiar la migración a través de membrana se utilizaron células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 cultivadas durante 24 horas en ausencia o presencia de doxiciclina (1 $\mu\text{g/ml}$) para inducir la expresión de la proteína SPRY1. A continuación las células se deplecionaron de suero (0,5% suero libre de tetraciclina) durante 24 horas más, manteniendo la estimulación con doxiciclina en los casos en los que correspondiese. Pasado ese tiempo, las células se tripsinizaron y se resuspendieron a razón de 3×10^5 células en 2 ml del medio de cultivo suplementado con 0,5% de suero libre de tetraciclina y se añadieron a la parte superior de una cámara transwell con un tamaño de poro de 8,0 μm (Corning, Carolina del Norte, EEUU). Como quimioatrayente, en el compartimento inferior se añadió medio de cultivo con suero al 10%. Las células se incubaron durante 6 horas a 37 °C. Pasado ese tiempo se retiró el inserto que contenía la membrana porosa, se fijaron las células con formaldehído al 4% y se tiñeron con cristal violeta, retirando las células que no habían migrado, y por lo tanto se encontraban en la cara superior de la membrana, con un bastoncillo de algodón.

El colorante absorbido por las células adheridas a la parte inferior de la membrana (células migratorias), se liberó con PBS 1x, 2% SDS durante 10 minutos y se midió la

absorbancia de la disolución obtenida a 570 nm en el lector de placas Infinite M200 (Tecan).

3.5.2.3. Estudio de la morfología celular por inmunofluorescencia

Las células se sembraron a una densidad de 2.500 células por pocillo sobre cristales redondos de 12 mm dentro de placas de cultivo multipocillo de 24 pocillos y se cultivaron en presencia o ausencia de doxiciclina durante 72 horas. Después, los cristales se lavaron con PBS 1x y las células se fijaron con etanol al 70% frío durante 10 minutos a -20 °C. Posteriormente las células se permeabilizaron con Tritón 0,1% en PBS y se bloquearon con una solución de albúmina sérica bovina (BSA, *bovine serum albumin*) al 1% en PBS. Las preparaciones se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes preparados en BSA al 1% en PBS durante 1 hora a 37 °C y luego con los anticuerpos secundarios conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC, *fluorescein isothiocyanate*) durante 30 minutos a 37 °C. Los núcleos se contratiñeron con DAPI (1 µg/µl; #D1306, Life Technologies). Finalmente los cristales se lavaron y se montaron con Mowiol (#475904, Merk Millipore, Massachusetts, EEUU). Las células se visualizaron y fotografiaron en un microscopio confocal de fluorescencia Leica TC5 SP5. Finalmente se cuantificó la circularidad celular con ayuda del programa de análisis de imagen ImageJ (National Institutes of Health, EEUU).

Los anticuerpos empleados aparecen detallados en la [Tabla 12](#).

Tabla 12. Relación de los anticuerpos empleados para inmunocitoquímica en esta Tesis.

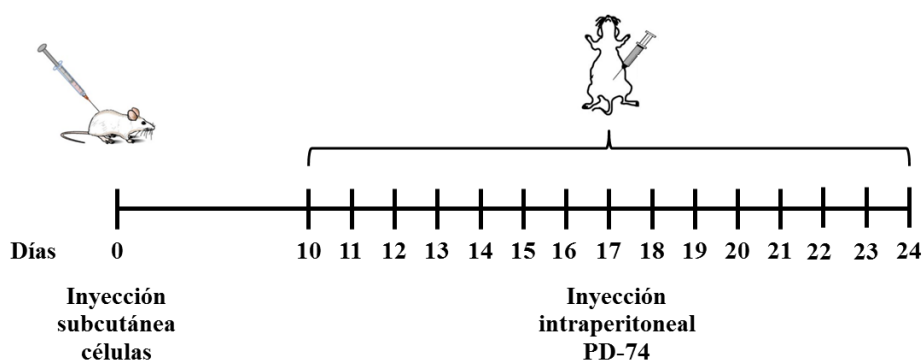
Reactivo	Dilución o concentración	Referencia, Casa comercial
Anti-Vimentina anticuerpo primario	1:200	#ab92547, Abcam
Anti-Faloidina-FITC	10 µg/ml	#P5282, Sigma-Aldrich
Anti-Rabbit-FITC anticuerpo secundario	1:100	#111-096-047, Jackson ImmunoResearch

3.5.3. Estudios de formación de tumores en ratones *in vivo*

Las células de sarcoma de Ewing POE o SKES se tripsinizaron y lavaron con PBS 1x frío. A continuación se resuspendieron en una disolución (1:1) de PBS/matrigel libre de

rojo fenol (#356237, Corning, Nueva York, EEUU) a razón de 5×10^7 células/mililitro. Se inyectaron 5×10^6 células subcutáneamente en un volumen de 100 μ l en el flanco de ratones C.B17/SCID de 6-8 semanas.

Se realizó un seguimiento del peso de los ratones utilizando una báscula y el tamaño tumoral utilizando un calibre durante todo el experimento. Cuando el tumor alcanzó un tamaño de 150-200 mm^3 (calculado utilizando la fórmula $L \cdot A^2 \cdot \pi / 6$, donde L es el lado más largo del tumor y A es en lado más corto), se inició el tratamiento que consistió en una dosis intraperitoneal diaria de 5, 10 o 20 mg/Kg de PD173074 disuelto en DMSO 10% - aceite de maíz 90% (Sigma-Aldrich) o placebo en el caso de los grupos control según el siguiente esquema:



Los ratones fueron sacrificados cuando el tumor alcanzó un volumen de 1.500 mm^3 . Todos los tumores fueron fijados en formalina y analizados mediante histología e inmunohistoquímica para determinar el número de células en mitosis y la presencia de apoptosis.

Los experimentos con animales fueron aprobados por los Comités de Ética y Bienestar Animal de las instituciones correspondientes.

3.5.4. Histología y estudios inmunohistoquímicos (IHQ)

Las muestras de tejido tumoral obtenidas se fijaron en formalina durante 24 horas y posteriormente se mantuvieron en etanol al 70% hasta que fueron embebidas en parafina.

Para el análisis inmunohistoquímico se realizaron cortes de 4 μm . El desenmascaramiento antigénico se realizó en microondas con la solución *Target Retrieval Solution* (#S2369, Dako, California, EEUU). Como anticuerpos primarios se utilizaron anti-cleaved caspase-3a policlonal de conejo (1:1000, #9661, Cell Signaling, Massachusetts, EEUU) a temperatura ambiente durante 60 minutos o anti-Ki67 monoclonal de conejo (1:200, #275R-15 clon SP6, Cell Marque, California, EEUU). Para la detección antigénica se utilizó el kit ImmPRESS Reagent Kit IgG anti-conejo (#MP-7401, VectorLabs, California, EEUU).

Las secciones cortadas se contra-tiñeron con hematoxilina/eosina (#H-3401, Vector laboratories). El número medio de células positivas se estableció analizando 10 campos a un aumento de 40X.

3.6. Análisis estadísticos

Para la comparación de dos grupos, se usó el test *T de Student* de dos colas asumiendo una distribución normal. Para la comparación del tamaño tumoral entre el grupo de animales control y el tratado, se usó un test de ANOVA de dos variables basado en el método Student-Newman-Keuls. Los estudios *in situ*, incluyendo la supervivencia global y la probabilidad de supervivencia libre de eventos, se analizaron con el test de log-rank. Para el análisis de proporciones se utilizó el test exacto de Fisher. Para todos los análisis, se consideraron diferencias significativas aquellas con $P < 0,05$. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.0 (*GraphPad Software*, California, EEUU).

4. Resultados

4.1. Perfil de expresión de SPRY1 en sarcoma de Ewing: regulación por EWS-FLI1

EWS-FLI1 regula negativamente la expresión de SPRY1 en células de sarcoma de Ewing A673.

Uno de los principales intereses de nuestro laboratorio durante los últimos años ha sido la identificación de los genes regulados por el factor de transcripción quimérico EWS-FLI1, característico del sarcoma de Ewing. Para ello, se estableció previamente una línea celular de sarcoma de Ewing (A673) que expresaba un ARN de interferencia contra EWS-FLI1 de manera condicional en respuesta a doxiciclina (Carrillo *et al.* 2007) (**Figura 4A**). Como puede observarse en la **Figura 4B**, la adición de doxiciclina a estas células provoca una reducción muy significativa de los niveles de EWS-FLI1, lo que convierte a este modelo celular en un sistema idóneo para la identificación de genes dependientes de EWS-FLI1.

Para identificar los genes regulados por EWS-FLI1 en las células A673/TR/shEF, se caracterizó el perfil de expresión génica mediante *microarrays* de expresión en células cultivadas en ausencia (niveles elevados de EWS-FLI1) o presencia de doxiciclina (niveles bajos de EWS-FLI1) durante 72 horas. En la **Figura 4C** se muestran los genes que experimentaron los mayores niveles de inducción o inhibición tras la reducción de los niveles de EWS-FLI1. Algunos de estos son genes regulados por EWS-FLI1 que han sido estudiados previamente por nuestro grupo como *DAX1* (*NR0B1*), *CCK* o *LOX* (Carrillo *et al.* 2007, Garcia-Aragoncillo *et al.* 2008, Agra *et al.* 2013). Como puede observarse en esta figura, *SPRY1* resultó ser uno de los genes más fuertemente reprimidos por EWS-FLI1 en estos experimentos.

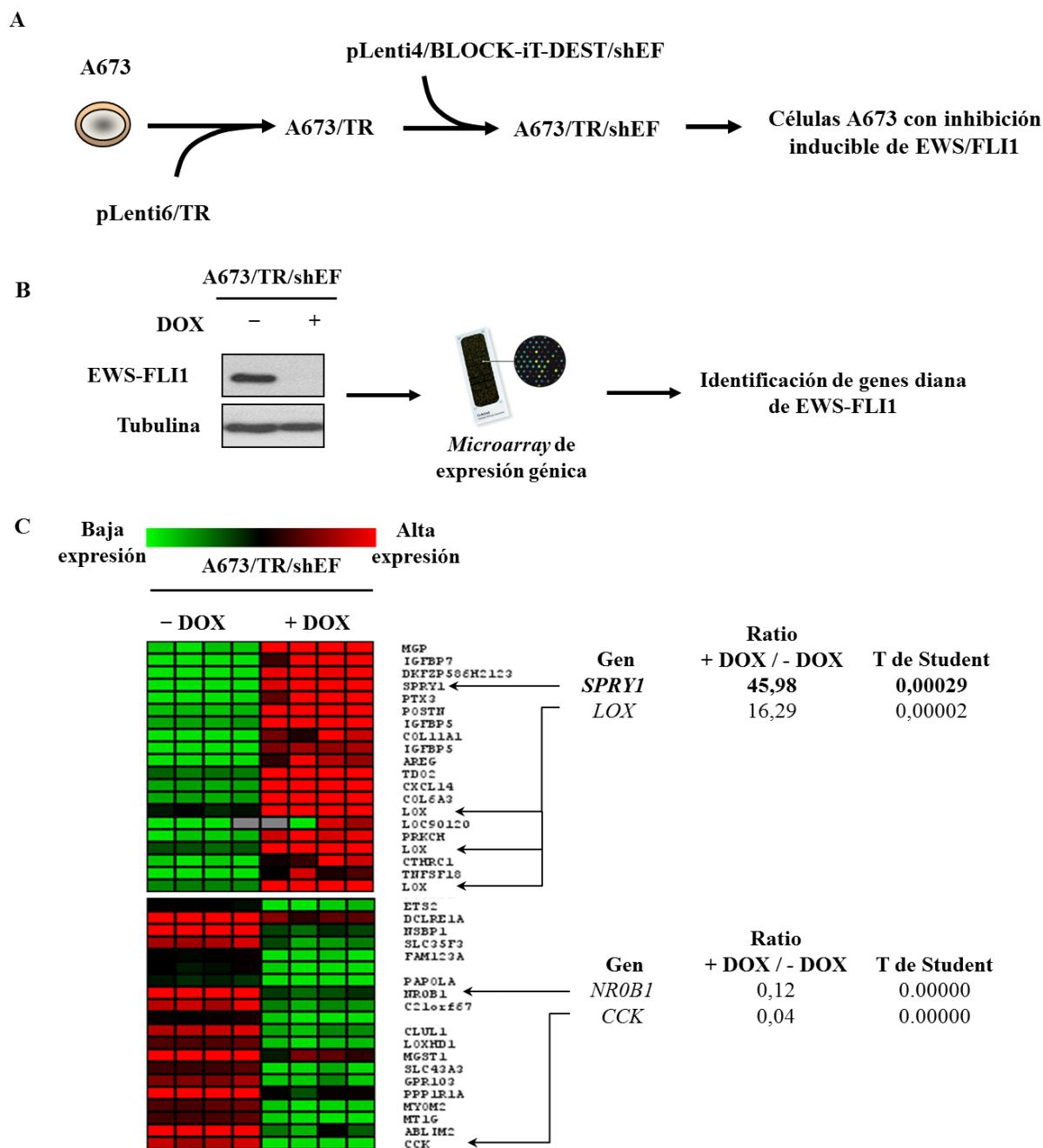


Figura 4. Identificación de genes regulados por EWS-FLI1 en células de sarcoma de Ewing A673. **A.** Establecimiento de la línea celular A673/TR/shEF. Esta línea expresa de manera condicional un shARN dirigido contra EWS-FLI1 (descrito en detalle en Carrillo *et al.* 2007). **B.** Se cultivaron células A673/TR/shEF en ausencia o presencia de doxíciclina (1 µg/ml) durante 72 horas para inducir la expresión del ARN de interferencia dirigido contra EWS-FLI1. Esas muestras fueron analizadas con un *microarray* de expresión génica. La figura muestra un esquema del planteamiento experimental así como un western blot donde se observa la inhibición de EWS-FLI1 en las células A673/TR/shEF tras el tratamiento con doxíciclina. **C.** La figura muestra un *heatmap* con los resultados del *array* y los principales genes reprimidos por EWS-FLI1 (top 20), como *SPRY1* o *LOX* (Agra *et al.* 2013). También se muestran los principales genes inducidos por EWS-FLI1 (top 20) como *CCK* (Carrillo *et al.* 2007) y *NR0B1* (García-Aragoncillo *et al.* 2008). Cada columna corresponde a una muestra diferente de cuatro experimentos independientes. El color verde significa niveles bajos de expresión y el rojo niveles altos de expresión de cada gen.

Para confirmar los resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo con *microarrays* de expresión, realizamos un análisis por RT-PCR cuantitativa. En estos experimentos cultivamos la línea celular A673/TR/shEF en ausencia o presencia de doxiciclina (1 µg/ml) durante 24, 48 o 72 horas y analizamos la expresión del ARNm de SPRY1. Como se puede observar en la **Figura 5A**, los niveles del ARNm de SPRY1 se indujeron más de 1000 veces en las células cultivadas con doxiciclina durante 72 horas y por tanto con niveles bajos de EWS-FLI1. Dado que existen otros 3 miembros de la familia de proteínas *Sprouty* llamados SPRY2, -3 y -4, decidimos estudiar si el efecto inhibidor de EWS-FLI1 sobre SPRY1 se observaba también en el resto de miembros de la familia de proteínas *Sprouty*. En la **Figura 5A** comprobamos como EWS-FLI1 ejerce una inhibición selectiva de SPRY1 con respecto al resto de miembros de su familia de proteínas. En la **Tabla 13** se muestra una comparativa de los resultados obtenidos en los *arrays* de expresión y los análisis de RT-PCR cuantitativa para los genes de la familia *Sprouty* donde se observa el mismo patrón de expresión empleando las dos técnicas. Se muestran también los valores obtenidos para *LOX* y *NR0B1*, dos genes diana de EWS-FLI1 previamente descritos por nuestro grupo (Mendiola *et al.* 2006, Agra *et al.* 2013).

Además, comprobamos mediante western-blot que la re-expresión de SPRY1 se observaba también a nivel de proteína (**Figura 5B**).

SPRY1 presenta cuatro variantes transcripcionales (VT 1-4) que difieren en el número de exones o bien se transcriben a partir de promotores alternativos (**Figura 6A**): la variante 1 (VT1) contiene 3 exones, la variante 2 (VT2) carece del exón 2 y las variantes 3 y 4 (VT3, VT4) también carecen del exón 2 pero presentan un exón nuevo cada una, con promotores alternativos. En las 4 variantes transcripcionales el último exón es el codificante y por lo tanto todas las variantes transcripcionales dan lugar a la misma proteína.

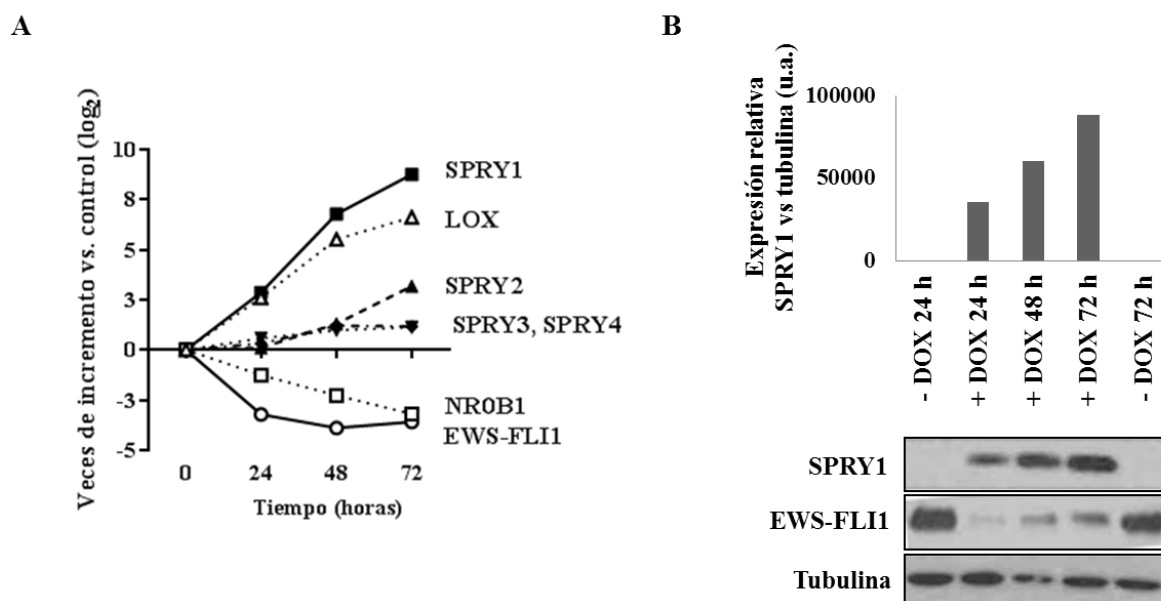


Figura 5. El silenciamiento de EWS-FLI1 induce un fuerte incremento de la expresión de SPRY1 a nivel de ARNm y proteína. A. Las células A673/TR/shEF se estimularon con doxíciclina durante periodos de 0, 24, 48 y 72 hs y se extrajo ARN total. Los niveles de ARNm de SPRY1 y EWS-FLI1 se cuantificaron mediante RT-PCR cuantitativa usando sondas Taqman específicas. La figura muestra los niveles relativos de expresión de *SPRY1*, -2, -3 y -4 tras la inhibición de EWS-FLI1 inducida con doxíciclina. Se incluyeron como controles EWS-FLI1 y dos de sus genes diana conocidos (*NR0B1* y *LOX*). En la figura se observa como la inhibición de EWS-FLI1 genera un incremento en los niveles de ARNm de SPRY1 de 1000 veces con respecto al control. Como era esperado, *LOX* aparece inducido y *NR0B1* reprimido tras la inhibición de EWS-FLI1. La figura muestra los resultados de un experimento independiente de un total de tres realizados. **B.** Células A673/TR/shEF testadas por western blot con anticuerpos específicos para SPRY1 y EWS-FLI1 a 24, 48 y 72 horas del tratamiento con doxíciclina. La figura muestra como el tratamiento con doxíciclina genera un fuerte incremento de SPRY1 dependiente del tiempo, que correlaciona con la inhibición de EWS-FLI1 a nivel de proteína. La gráfica muestra los niveles relativos de expresión de la proteína SPRY1 vs tubulina, que fue usado como control de carga (u.a., unidades arbitrarias de densitometría).

Tabla 13. Comparación de los ratios de expresión de cada gen tras la inhibición de EWS-FLI1 analizados mediante *microarrays* de expresión o RT-PCR cuantitativa.

	Ratio + DOX / - DOX			
	Microarray		RT-PCR cuantitativa	
SPRY1	45,98 ± 13,3	(<i>P</i> = 0,0002)	430,5 ± 11,35	(<i>P</i> = 0,0003)
SPRY2	5,73 ± 1,51	(<i>P</i> = 0,0016)	9,1 ± 2,37	(<i>P</i> = 0,0002)
SPRY3	0,97 ± 1,12	(<i>P</i> = 0,79)	2,1 ± 0,3	(<i>P</i> = 0,0002)
SPRY4	2,09 ± 0,76	(<i>P</i> = 0,018)	2,2 ± 0,32	(<i>P</i> = 0,0001)
LOX	21,16 ± 4,42	(<i>P</i> < 0,0001)	97,7 ± 12,1	(<i>P</i> = 0,0012)
NR0B1	0,12 ± 0,01	(<i>P</i> < 0,0001)	0,1 ± 0,02	(<i>P</i> = 0,0003)

Para determinar si la inhibición de EWS-FLI1 afectaba a la expresión de estas variantes de SPRY1 de forma diferente, analizamos el perfil de expresión de cada una de las variantes mediante RT-PCR cuantitativa utilizando cebadores específicos de cada isoforma. En la **Figura 6B** observamos como las variantes 2, -3 y -4 de SPRY1 experimentan un incremento de aproximadamente 40-60 veces tras la inhibición de EWS-FLI1 con respecto al control. La isoforma 1, por el contrario, presenta una menor regulación por EWS-FLI1, alcanzando 20 veces de incremento tras la inhibición de EWS-FLI1 al comparar la muestra tratada frente al control. Además, en la **Figura 6C** vemos un patrón similar al cargar esas muestras en un gel de agarosa. Por lo tanto, concluimos que las isoformas 2, -3 y -4 de SPRY1 son las isoformas preferentemente inducidas tras la inhibición de EWS-FLI1.

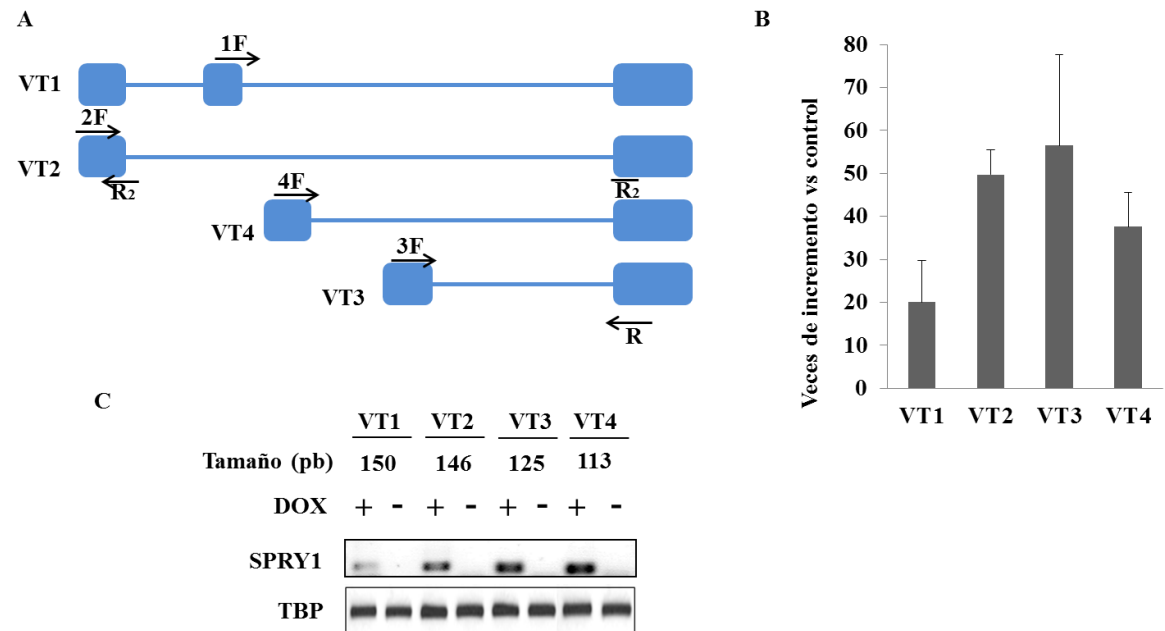


Figura 6. Efecto del silenciamiento de EWS-FLI1 sobre la expresión de las 4 variantes transcripcionales de SPRY1. **A.** SPRY1 presenta 4 variantes transcripcionales. El esquema muestra cada una de las variantes transcripcionales (VT1-4) así como la localización de los cebadores empleados (flechas), donde el cebador R₂ se emplea para diferenciar la VT1 de la VT2. **B.** RT-PCR cuantitativa con cebadores específicos para cada una de las 4 variantes transcripcionales de SPRY1 tras 72 horas de tratamiento con doxiciplina en células A673/TR/shEF para inducir la expresión del ARN de interferencia contra EWS-FLI1. La gráfica muestra la inducción de los niveles de ARNm de las 4 variantes transcripcionales de SPRY1. Las variantes 2, -3 y -4 se inducen mayoritariamente al inhibir EWS-FLI1. **C.** Gel de agarosa en el que se muestran los niveles de expresión de las 4 variantes de SPRY1. Se indica el tamaño en pares de bases (pb) de cada una de las variantes. TBP (*TATA binding protein*) se empleó como control de carga.

Los resultados mostrados hasta ahora indican que EWS-FLI1 inhibe la expresión de SPRY1 en la célula de sarcoma de Ewing A673 y que los niveles de expresión de SPRY1, tanto a nivel de ARNm como de proteína son muy bajos. A continuación, por tanto, decidimos estudiar los niveles de expresión de SPRY1 y el resto de miembros de la familia *Sprouty* en otras líneas celulares derivadas de sarcoma de Ewing. Para ello, se seleccionó un panel de 8 líneas celulares de sarcoma de Ewing (A4573, RDES, SKPNDW, TTC466, SKES, TC71, SKNMC y células A673 parentales).

En la **Figura 7A** se observa que SPRY1 presenta el nivel más bajo de expresión en comparación con el resto de miembros de la familia *Sprouty* en las células de sarcoma de Ewing estudiadas. Además, mediante western blot comprobamos que los niveles de expresión de SPRY1 eran muy bajos o indetectables en todas estas células (**Figura 7B**).

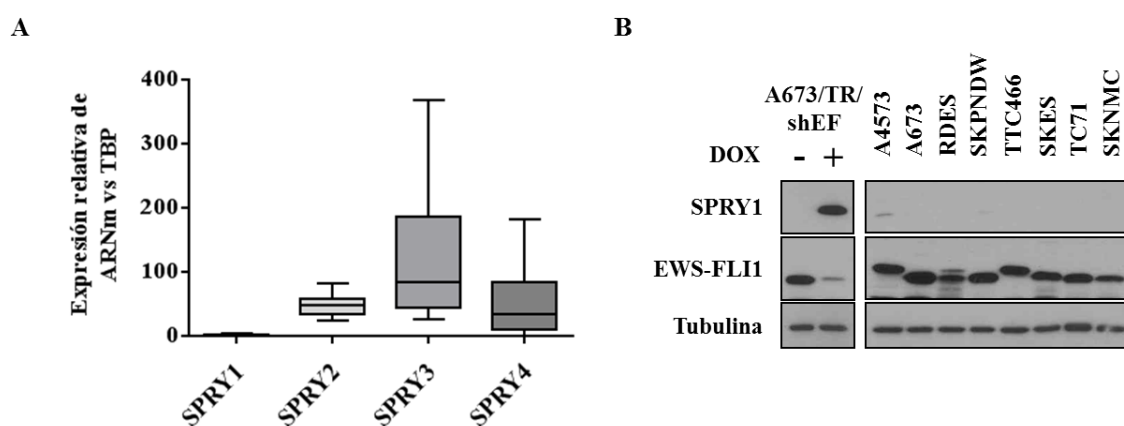


Figura 7. Los valores de expresión de SPRY1 son bajos en relación con el resto de miembros de la familia de proteínas *Sprouty* en líneas celulares de sarcoma de Ewing. **A.** Se extrajo ARNm de una selección de 8 líneas celulares de sarcoma de Ewing (A4573, A673, RDES, SKPNDW, TTC466, SKES, TC71 y SKNMC) y se analizó por RT-PCR cuantitativa utilizando sondas Taqman específicas para SPRY1, -2, -3 y -4. La figura muestra como SPRY1 es el miembro de la familia de proteínas *Sprouty* que presenta una expresión más baja en líneas de sarcoma de Ewing. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar. **B.** Se realizó un western blot de la proteína extraída de líneas celulares de sarcoma de Ewing con diferentes fusiones de EWS-FLI1 (A4573, A673, RDES, SKPNDW, TTC466, SKES, TC71 y SKNMC) utilizando anticuerpos específicos contra SPRY1 y EWS-FLI1. Se utilizaron células A673/TR/shEF tratadas con doxiciclina (+ DOX) como controles positivos para la expresión de SPRY1. La tubulina se utilizó como control de carga. La figura muestra como SPRY1 no se expresa en las células de sarcoma de Ewing.

Para comprobar si los resultados obtenidos en nuestro laboratorio concordaban con los datos disponibles en las bases de datos públicas, se compararon los niveles de expresión de SPRY1 en líneas celulares de diferentes tipos tumorales procedentes de la base de datos pública *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE, Broad Institute, <http://www.broadinstitute.org/ccle>) que contiene datos de expresión procedentes de más de 1000 líneas celulares de 37 tumores diferentes. Como se puede observar en la **Figura Suplementaria 1**, las células de sarcoma de Ewing presentan los niveles de expresión de SPRY1 más bajos.

A continuación, analizamos los niveles de expresión de SPRY1 mediante RT-PCR cuantitativa y del resto de miembros de la familia *Sprouty* en una selección de muestras tumorales de Ewing (n=11). Como se muestra en la **Figura 9**, los niveles de expresión de SPRY1 fueron mucho más bajos en comparación con los niveles de SPRY2, -3 y -4.

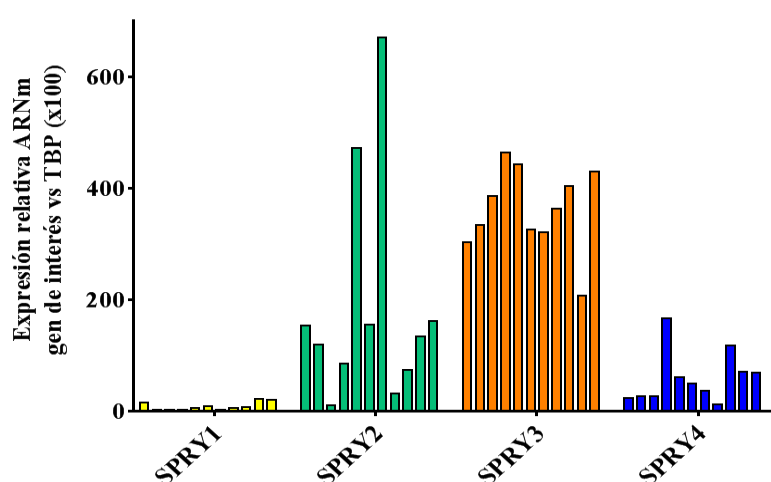


Figura 9. SPRY1 se expresa a niveles inferiores en tumores primarios de sarcoma de Ewing en comparación con el resto de miembros de la familia de proteínas *Sprouty*. Se analizaron los niveles de expresión de SPRY1, -2, -3 y -4 en una selección de tumores primarios de sarcoma de Ewing (n=11). Los niveles de ARNm se cuantificaron por RT-PCR cuantitativa utilizando sondas Taqman específicas. La gráfica muestra la expresión relativa de cada gen con respecto a TBP.

Posteriormente analizamos los perfiles de expresión de SPRY1 y del resto de miembros de la familia *Sprouty* en una serie de líneas celulares procedentes de otros tumores pediátricos, para determinar si estos genes presentaban niveles diferentes de expresión en función del tipo de tumor. La selección incluía células de neuroblastoma (IMR32,

SKNSH, SHSY5Y y SKNAS), rhabdomyosarcoma (CW9019) y osteosarcoma (SAOS-2 y U2OS). En la **Figura 10** se observa que SPRY1 no se expresa en las células estudiadas a excepción de la línea celular de neuroblastoma SKNAS, donde SPRY1 presenta niveles elevados de expresión tanto a nivel de ARNm (**Figura 10A**) como a nivel proteína (**Figura 10B**). Este resultado concuerda con los datos publicados en la *Cancer Cell Line Encyclopedia*, donde la célula SKNAS ocupa la segunda posición entre las líneas celulares de cáncer con la mayor expresión de SPRY1 (**Tabla Suplementaria 1**).

En cuanto a los niveles de expresión comparativos de ARNm de los diferentes miembros de la familia de proteínas *Sprouty* en líneas de otros tumores pediátricos, se observa una gran variabilidad en la expresión de SPRY1, -2 y -4, mientras que los niveles de SPRY3 permanecen muy bajos (**Figura 10A**).

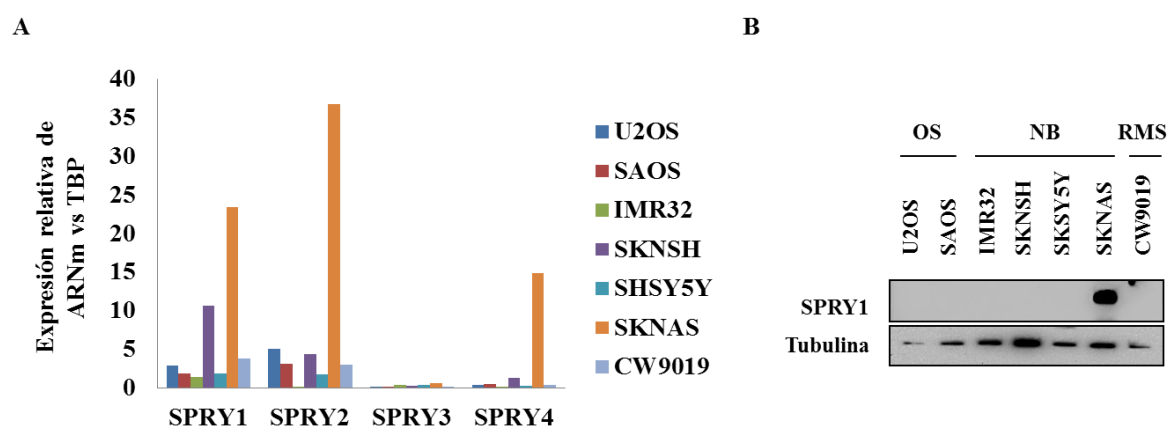


Figura 10. Expresión de SPRY1 en líneas celulares de otros tumores sólidos pediátricos.

A. Se extrajo ARN total de una selección de líneas celulares de diferentes tumores sólidos pediátricos (neuroblastoma (NB; IMR32, SKNSH, SHSY5Y y SKNAS), rhabdomyosarcoma (RMS; CW9019) y osteosarcoma (OS; U2OS y SAOS) y se analizó por RT-PCR cuantitativa utilizando sondas Taqman específicas para SPRY1, -2, -3 y -4. **B.** La proteína SPRY1 no se expresa en ninguna de las líneas de tumores sólidos estudiados excepto en la línea celular de neuroblastoma SKNAS. La figura muestra un análisis por western blot de proteína extraída de una colección de líneas celulares de diferentes tumores sólidos pediátricos (neuroblastoma (IMR32, SKNSH, SHSY5Y y SKNAS)), rhabdomyosarcoma (CW9019) y osteosarcoma (U2OS y SAOS) analizada con un anticuerpo específico para la proteína SPRY1. La tubulina se utilizó como control de carga.

Finalmente analizamos los niveles de expresión de SPRY1, -2, -3 y -4 mediante RT-PCR cuantitativa en tejidos normales y lo comparamos con lo observado en las líneas celulares y muestras tumorales. Como se puede observar en la [Figura 11](#), en general los tejidos normales presentan niveles bajos de expresión en comparación con el resto de miembros de la familia *Sprouty*. El tejido que presenta mayor expresión de SPRY1 es el tejido adiposo, seguido por vejiga, útero, esófago, colon, corazón, pulmón, próstata, músculo y tráquea ([Figura 11](#)). Estos resultados concuerdan con los datos presentes en el proyecto *Genotype-Tissue Expression* (GTEx), que agrupa una colección de múltiples tejidos humanos que han sido genotipados y analizados con *arrays* de expresión, donde el tejido no tumoral con mayor expresión de SPRY1 es el adiposo ([Figura Suplementaria 2](#)).

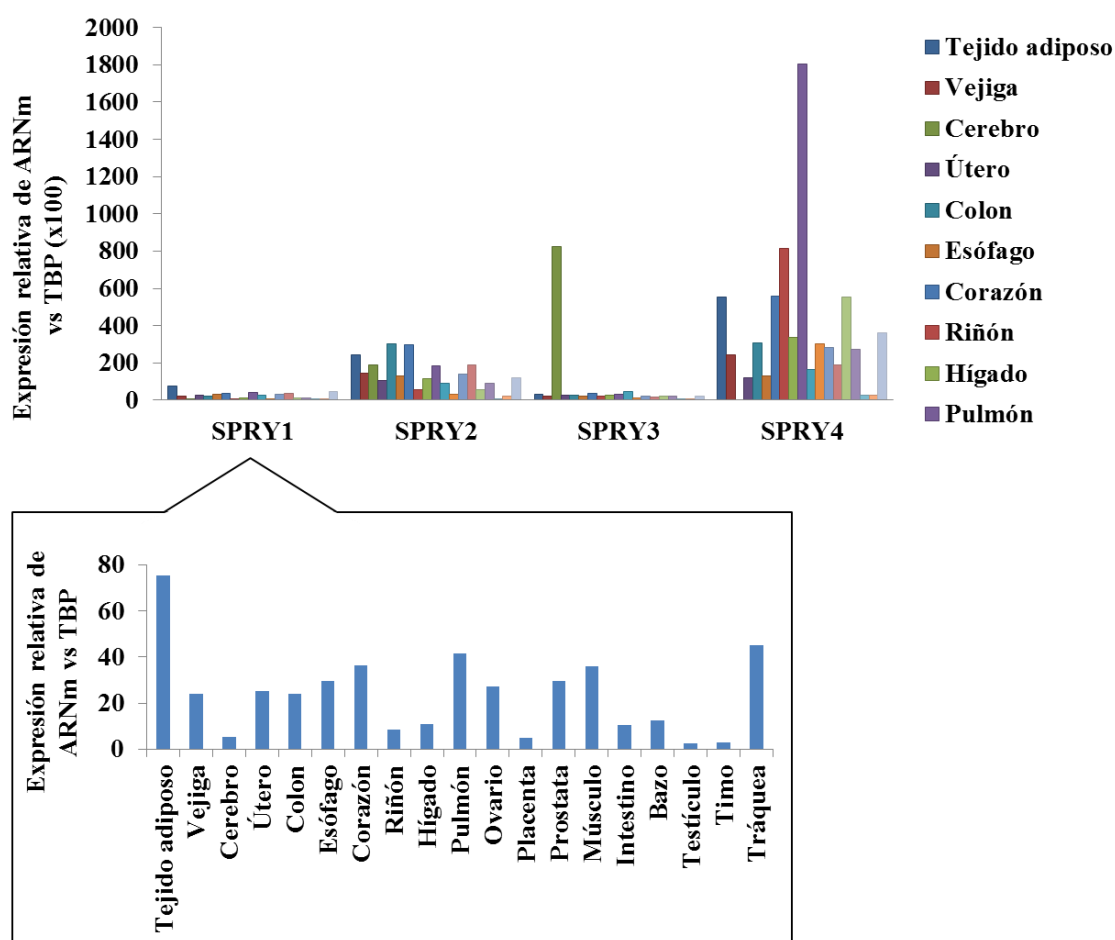


Figura 11. Expresión de SPRY1 en tejidos no tumorales. Se empleó ARN comercial de una batería de tejidos no tumorales (Clontech) y se analizó la expresión de SPRY1-4 por RT-PCR cuantitativa utilizando una sonda Taqman específica. En la gráfica superior se puede observar como SPRY1 se expresa a niveles relativamente bajos en comparación con el resto de miembros de la familia *Sprouty*. En la ampliación se observa como SPRY1 se expresa a niveles más elevados en tejido adiposo mientras que timo y testículos son los tejidos donde hay una expresión más reducida.

La regulación de *SPRY1* por EWS-FLI1 en células A673 podría estar mediada por un mecanismo epigenético

Los resultados mostrados hasta el momento en esta Tesis indican que *SPRY1* es un gen regulado selectiva y negativamente por EWS-FLI1, pero no demuestran si esta regulación es directa o indirecta. Con el objeto de avanzar en esta cuestión analizamos tres experimentos de ChIP-seq publicados previamente (Bilke *et al.* 2013, Riggi *et al.* 2014, Tomazou *et al.* 2015). En estos trabajos los autores realizaron experimentos de ChIP-seq para identificar los sitios de unión de EWS-FLI1 en el genoma así como la distribución de las marcas epigenéticas de histonas. En los tres estudios se utilizó como modelo la línea celular A673, comparando los resultados obtenidos en células con expresión alta o baja de EWS-FLI1 (Bilke *et al.* 2013, Riggi *et al.* 2014, Tomazou *et al.* 2015). Además, en dos de estos estudios (Bilke *et al.* 2013, Tomazou *et al.* 2015) se utilizó la línea celular A673/TR/shEF desarrollada en nuestro laboratorio (Carrillo *et al.* 2007) y que se ha empleado para los estudios descritos en esta Tesis.

En la **Figura 12A** se muestran los resultados obtenidos a partir de los datos publicados en los trabajos de Bilke *et al.* y Tomazou *et al.* (Bilke *et al.* 2013, Tomazou *et al.* 2015). Como se puede ver en esta figura, EWS-FLI1 no se une de forma directa al promotor de *SPRY1* o a regiones colindantes. De hecho, las marcas de unión de EWS-FLI1 al genoma más cercanas al gen de *SPRY1* se encuentran a una distancia de más de 120 kb (no mostrado). Estos resultados sugieren que EWS-FLI1 no se une directamente al promotor de *SPRY1*, aunque no es posible descartar totalmente que regiones lejanas puedan estar implicadas en su regulación.

Por otro lado, en las **Figuras 12A,B** se puede ver como la inhibición de EWS-FLI1 genera un incremento en las marcas de histona H3K27ac localizadas en la región promotora putativa de *SPRY1*, que comprende el exón 1 y el intrón 1. Esto sugiere que la inhibición transcripcional de *SPRY1* por EWS-FLI1 podría estar relacionada con un mecanismo epigenético que involucrase modificaciones de histonas, en vez de una unión directa de EWS-FLI1 al promotor de *SPRY1*.

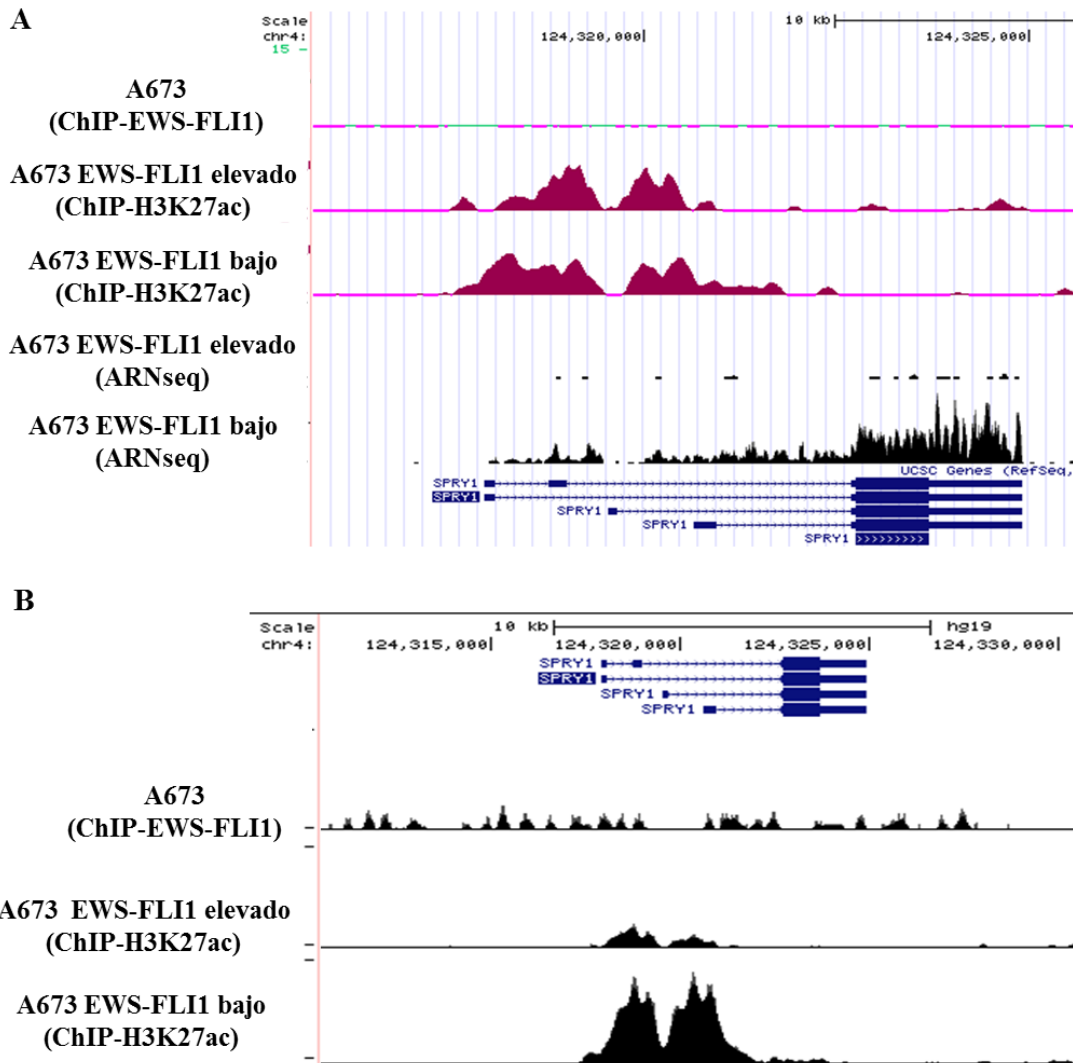


Figura 12. Los datos de ChIP-seq publicados en otros estudios sugieren que SPRY1 no es una diana directa de EWS-FLI1. Los datos que aquí se muestran derivan de estudios ya publicados donde se empleó la línea celular A673/TR/shEF con inhibición condicional de EWS-FLI1. **A.** La figura muestra las regiones genómicas cercanas al gen SPRY1 junto a un ChIP-seq para EWS-FLI1 (Bilke *et al.* 2013), un ChIP-seq-H3K27ac y un ARNseq (Tomazou *et al.* 2015). **B.** La figura muestra la región genómica cercana a SPRY1 junto a datos de ChIP-seq de Riggi *et al.* (Riggi *et al.* 2014). Se puede observar que no hay marcas específicas para EWS-FLI1 en la región promotora putativa de SPRY1, pero que al inhibir EWS-FLI1, aumenta la señal de H3K27ac, lo que sugiere que SPRY1 podría estar siendo regulado por un mecanismo epigenético.

Por otro lado, tratamos células A673 de sarcoma de Ewing con un inhibidor de la histona desacetilasa 1 (HDAC1) llamado *Suberoylanilide Hydroxamic Acid* (SAHA) o vorinostat durante 24 horas. En la **Figura 13A** observamos que a la concentración empleada (1 μ M) el inhibidor SAHA era capaz de restituir la expresión del ARNm de SPRY1 2,5 veces de forma significativa en células A673. Por otro lado, estudiamos el efecto de un inhibidor de la actividad de la ADN metiltransferasa, que genera la

desmetilación del ADN (5-aza-2'-deoxicitidina, "5-aza"). En la **Figura 13B** se observa como en este caso, la inhibición de la metilación en células A673 no tiene un efecto sobre la expresión del ARNm de *SPRY1*.

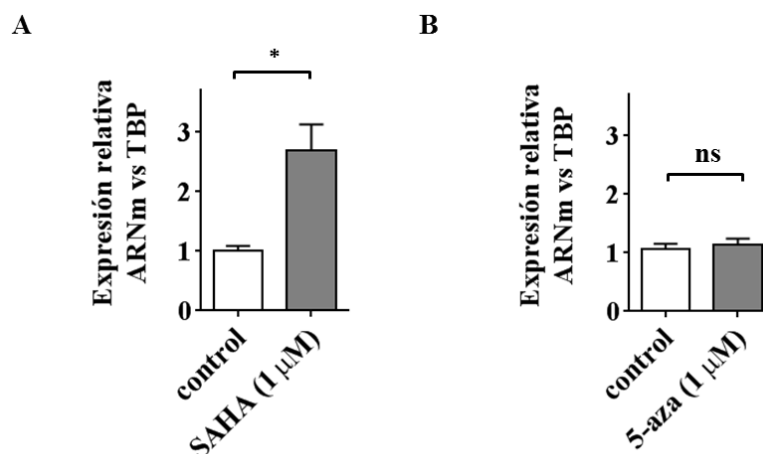


Figura 13. La inhibición de la desacetilación de histonas induce la expresión de *SPRY1* en células de sarcoma de Ewing. Células A673 de sarcoma de Ewing se trataron con el inhibidor de la desacetilación de histonas SAHA (1 μM) (**A**) o el inhibidor de la ADN metiltransferasa 5-aza-2'-deoxycitidina (5-aza) (1 μM) (**B**) durante 24 o 96 horas respectivamente y posteriormente se cuantificó la expresión de ARNm de *SPRY1*. La figura muestra como el tratamiento con SAHA genera un incremento significativo en la expresión de *SPRY1* (* $P = 0,018$), mientras que el tratamiento con 5-aza no genera cambios significativos. (ns: no significativo).

Por lo tanto, estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis de los datos de ChIP-seq e indican que la regulación de EWS-FLI1 sobre *SPRY1* probablemente no sea directa.

En resumen, los resultados mostrados en esta sección indican que EWS-FLI1 regula negativamente la expresión de *SPRY1* en las células de sarcoma de Ewing A673 y que los niveles de expresión de *SPRY1* son muy bajos o indetectables en una serie amplia de células de sarcoma de Ewing, lo que sugiere que esta es una característica común de este tipo tumoral.

Como se ha comentado en la introducción, varios estudios sugieren que *SPRY1* puede actuar como un supresor tumoral en diferentes tipos de cáncer (Kwabi-Addo *et al.* 2004, Lo *et al.* 2004, Macia *et al.* 2012, Masoumi-Moghaddam *et al.* 2014a, Liu *et al.* 2015), aunque se desconoce el mecanismo exacto.

Todo esto sugiere que SPRY1 podría actuar como un supresor tumoral también en sarcoma de Ewing. Por ello, el siguiente objetivo que abordamos en esta Tesis fue estudiar el rol de SPRY1 en la patogénesis del sarcoma de Ewing.

4.2. SPRY1 es un gen supresor de tumores en sarcoma de Ewing

Establecimiento de modelos celulares de expresión inducible de SPRY1 en células de sarcoma de Ewing.

Con el objetivo de estudiar el rol de SPRY1 generamos un sistema inducible de re-expresión de SPRY1 dependiente de doxíciclina en células de sarcoma de Ewing. Decidimos generar tres líneas celulares diferentes (A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1) para de esta forma poder sacar conclusiones que fueran representativas de los sarcomas de Ewing en general. Dos de estas células, A673 y SKNMC, expresan la fusión EWS-FLI1 de tipo I mientras que las células SKES expresan la fusión EWS-FLI1 de tipo II. Las células parentales fueron infectadas con el vector lentiviral pLenti6/TR para expresar de manera estable el represor de tetraciclina (A673/TR, SKES/TR y SKNMC/TR), y posteriormente con el vector pLenti4/TO/V5-DEST que incluía el ADNc de SPRY1 bajo el control de un promotor inducible por doxíciclina (**Figura 14A**). El resultado fue la generación de tres líneas celulares (A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1) que expresaban SPRY1 tras la estimulación con doxíciclina (**Figura 14B**). Las tres líneas celulares A673/TR, SKES/TR y SKNMC/TR fueron también infectadas con el vector lentiviral pLenti4/TO/V5-DEST vacío (*Empty*) y fueron utilizadas como controles en todos los experimentos funcionales.

De cada línea celular generada se obtuvieron poblaciones policlonales, que fueron posteriormente utilizadas para la obtención de clones. Estos clones fueron analizados independientemente para verificar la inducción de SPRY1 en respuesta a doxíciclina por western blot (**Figura 14B**) y se seleccionaron aquellos clones que demostraron una expresión más elevada de SPRY1 para realizar los estudios funcionales posteriores.

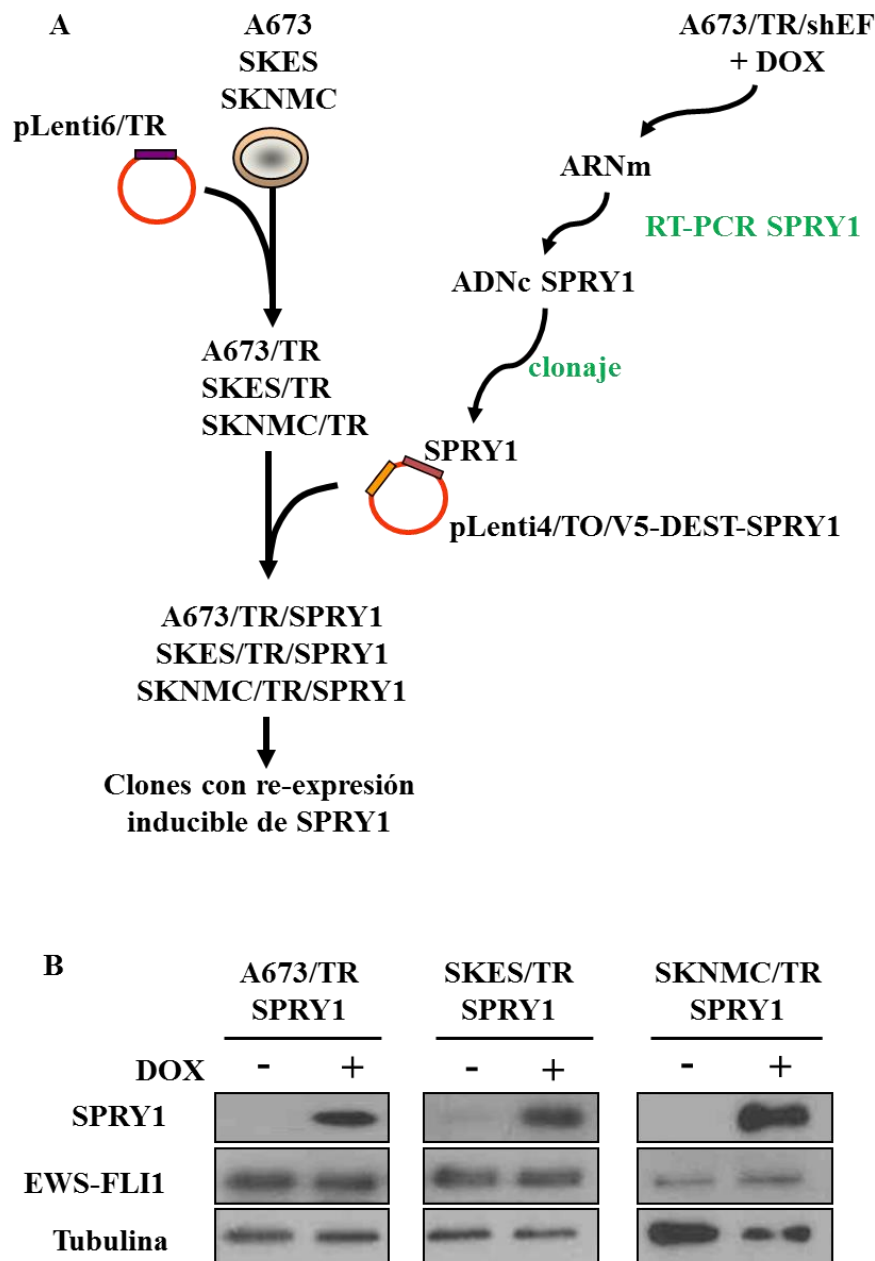


Figura 14. Establecimiento de modelos celulares de re-expresión de SPRY1 en tres líneas de sarcoma de Ewing. **A.** Las células A673, SKES y SKNMC de sarcoma de Ewing fueron primero infectadas con el vector pLenti6/TR para dar lugar a las células A673/TR, SKES/TR y SKNMC/TR. A continuación, estas células fueron infectadas con el vector pLenti4/TO/V5-DEST-SPRY1 para dar lugar a las células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1, en las que la expresión de SPRY1 se regulaba mediante la incubación con doxiciplina. **B.** La figura muestra la inducción de SPRY1 tras 72 horas de tratamiento con doxiciplina (1 µg/ml) en las células A673, SKES y SKNMC infectadas con el sistema inducible de SPRY1. A estas muestras se les extrajo proteína con la que se realizó un western blot. Las hibridaciones con anticuerpos específicos muestran como SPRY1 se induce a nivel de proteína tras el tratamiento, mientras que EWS-FLI1 se mantiene constante. Se empleó tubulina como control de carga.

Es importante destacar que en estas tres líneas celulares la expresión de EWS-FLI1 se mantiene inalterada tras la incubación con doxíciclina, como podemos observar en la **Figura 14B**. Por lo tanto, este sistema es válido para analizar las consecuencias de la re-expresión de SPRY1 en las células de sarcoma de Ewing, independientemente de EWS-FLI1.

La re-expresión de SPRY1 inhibe la proliferación y aumenta el tiempo de duplicación de las células de Ewing.

Con el objetivo de analizar el efecto de la re-expresión de SPRY1 sobre las células de sarcoma Ewing, estudiamos en primer lugar su posible influencia sobre la proliferación celular. Para ello empleamos el sistema xCELLigence, que permite monitorizar en tiempo real la proliferación celular y calcular el tiempo de duplicación.

En la **Figura 15A** podemos observar como las células tratadas con doxíciclina, y que por lo tanto re-expresaban SPRY1, proliferaron menos que las células control cultivadas en ausencia de doxíciclina (entre un 35% y un 60% menos al final del experimento). Además, el tiempo de duplicación se incrementó en todas las líneas celulares estimuladas con doxíciclina de forma significativa: de $16,3 \pm 1,9$ a $25,1 \pm 3,4$ horas para A673/TR/SPRY1 ($P = 0,004$), de $16,8 \pm 2,06$ a $24,02 \pm 3,1$ horas para SKES/TR/SPRY1 ($P = 0,006$) y de $11,7 \pm 1,3$ a $17,6 \pm 2,4$ horas para SKNMC/TR/SPRY1 ($P = 0,003$) (**Figura 15B**).

En la **Figura 16** se muestran fotografías representativas de las tres líneas celulares cultivadas en ausencia o presencia de doxíciclina (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 10 días. Como se puede observar en la mencionada figura, la re-expresión de SPRY1 produce una disminución evidente del número de células.

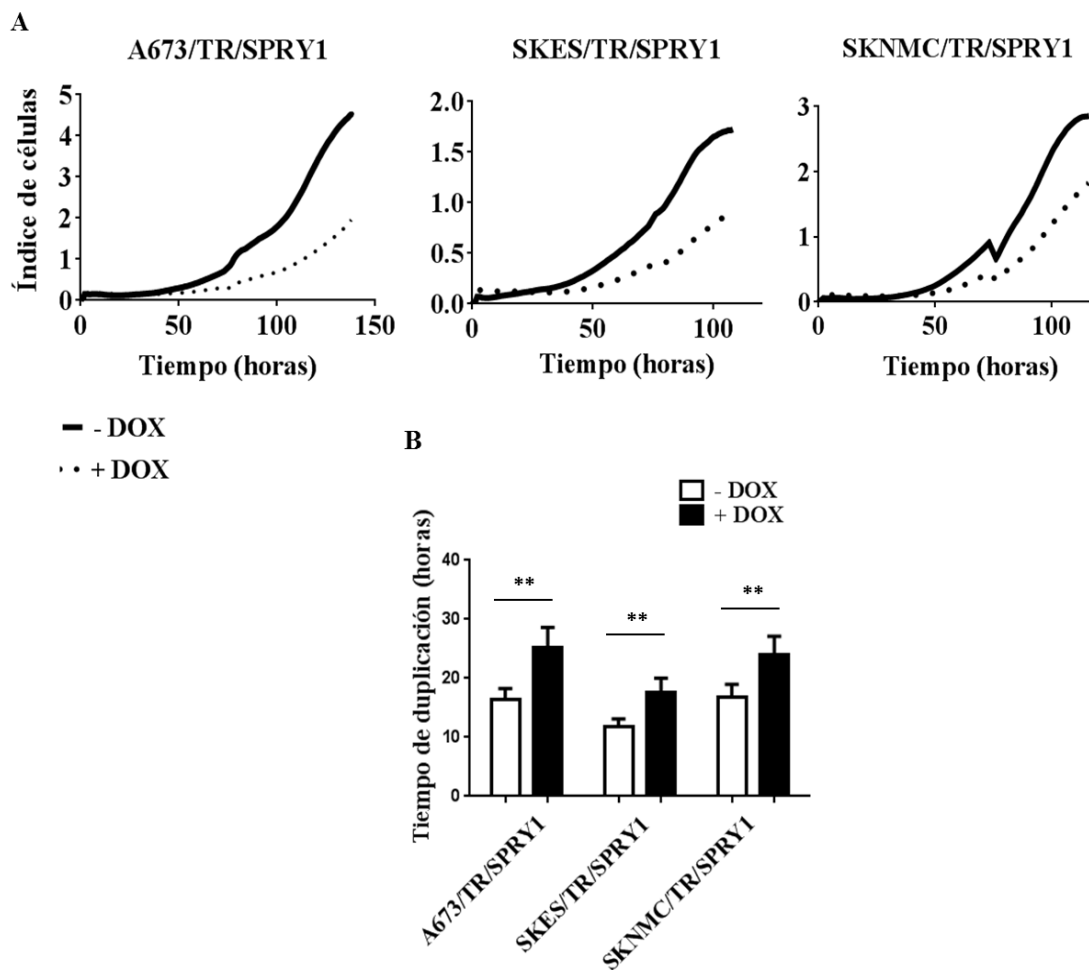


Figura 15. La re-expresión de SPRY1 inhibe la proliferación de células de sarcoma de Ewing medida en tiempo real. Se midió la proliferación celular de las células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 empleando la tecnología xCELLigence en ausencia o presencia de doxiciplina (DOX, 1 $\mu\text{g/ml}$). **A.** Las gráficas muestran las curvas de crecimiento de las células cultivadas con o sin re-expresión de SPRY1 durante 120 horas donde se observa como la re-expresión de SPRY1 inhibe la proliferación de las tres líneas celulares de sarcoma de Ewing. Se muestra un experimento representativo de un total de tres realizados. Los artefactos de la gráfica que se observan a las 72 horas son consecuencia del inevitable cambio de medio realizado y el posterior reajuste de las condiciones del aparato xCELLigence. Este artefacto no afecta al resultado final. **B.** La gráfica muestra cómo la re-expresión de SPRY1 aumenta el tiempo de duplicación de las tres líneas celulares (media \pm desviación estándar; ** $P < 0,01$).

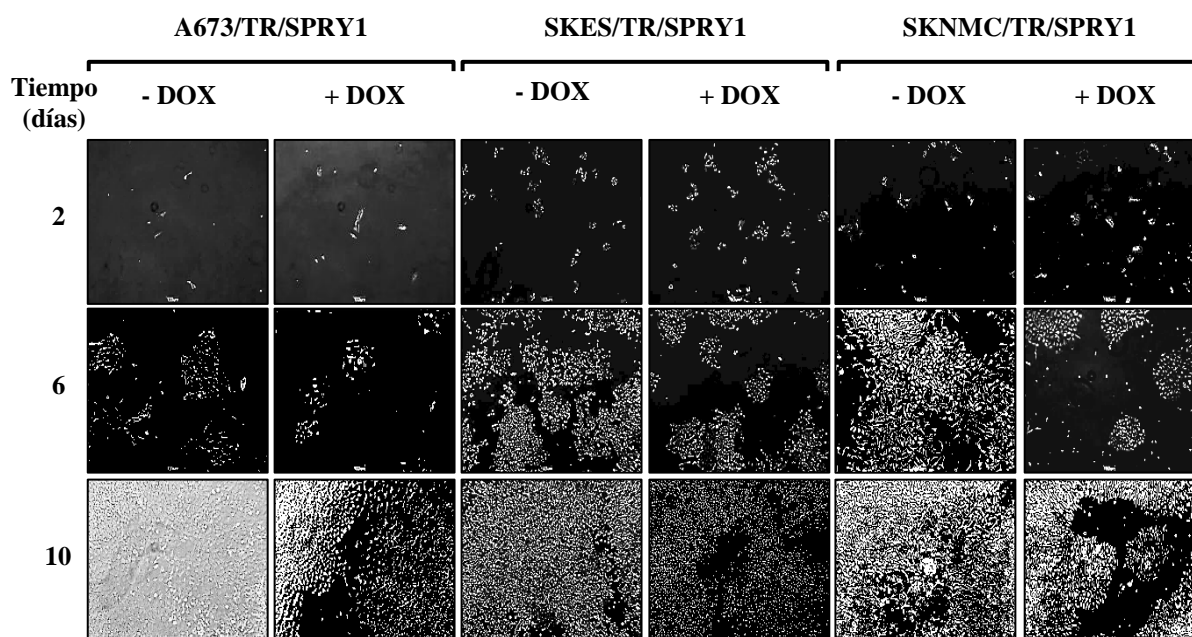


Figura 16. Proliferación a tiempos largos en líneas celulares de sarcoma de Ewing con re-expresión de SPRY1. Se sembraron células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 a baja densidad y se mantuvieron en cultivo durante 10 días en ausencia o presencia de doxíciclina (DOX +/-, 1 µg/ml). Se muestran fotos representativas de la progresión de la proliferación celular en tres puntos del tiempo (días 2, 6 y final del experimento a día 10).

De forma complementaria, se realizaron estudios de síntesis de ADN mediante incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) para determinar el efecto de SPRY1 sobre la proliferación celular.

En condiciones estándar de cultivo (medio suplementado con 10% de SFB) la re-expresión de SPRY1 provocó una inhibición de la incorporación de BrdU entre el 30 y el 50% dependiendo del tipo celular (**Figura 17A**). Estos mismos ensayos se realizaron también en condiciones restrictivas de suero (medio suplementado con 1% de SFB) y se observó que el efecto de la re-expresión de SPRY1 fue aún más acusado, obteniéndose inhibiciones de la proliferación de entre el 50 y el 65% con respecto a las células control cultivadas en ausencia de doxíciclina (**Figura 17B**). Estos resultados sugieren que en condiciones en las que la disponibilidad de factores de crecimiento es más limitada, como podría ser el microentorno tumoral, la re-expresión de SPRY1 podría generar una inhibición más fuerte de la proliferación celular.

No se observaron diferencias en las células control infectadas con el vector lentiviral vacío cultivadas en paralelo en ausencia o en presencia de doxiciclina, indicando que los efectos observados eran específicos de la re-expresión de SPRY1 (**Figura 17C**).

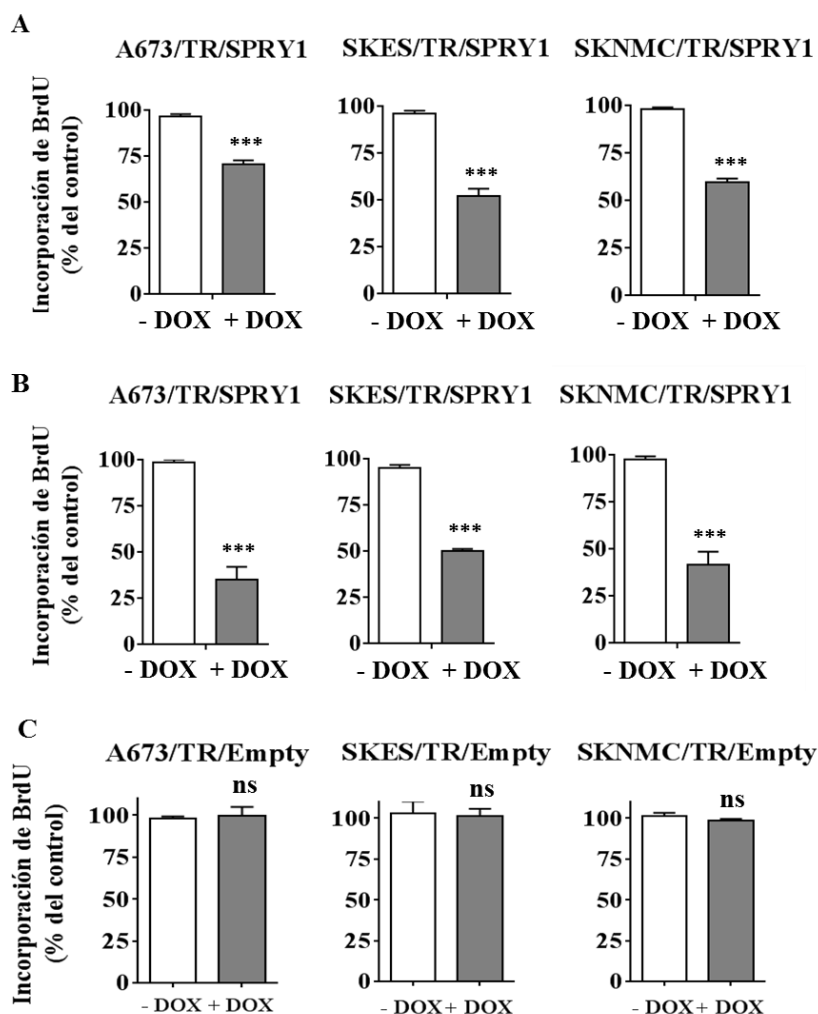


Figura 17. La re-expresión de SPRY1 inhibe la proliferación de células de sarcoma de Ewing en condiciones estándar y restrictivas de suero. **A.** Se sembraron células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 en octuplicados y se cultivaron en ausencia o presencia de doxiciclina (DOX, 1 μ g/ml) durante 72 horas en medio suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) libre de tetraciclina (condiciones estándar de cultivo). Se midió la proliferación celular por incorporación de BrdU al ADN. Las gráficas muestran el porcentaje de la incorporación de BrdU en las células que re-expresan SPRY1 vs control. La figura muestra un experimento representativo (media \pm desviación estándar) de tres realizados (** $P < 0,005$). **B.** Las células se cultivaron como se describe en el apartado A, pero se mantuvieron al 1% de SFB (condiciones restrictivas de suero). La proliferación se midió por incorporación de BrdU y se observó una inhibición significativa en las células tratadas con doxiciclina (células con re-expresión de SPRY1) vs control. La figura muestra un experimento representativo (media \pm desviación estándar) de tres experimentos independientes realizados (** $P < 0,005$). **C.** Las células A673/TR/Empty, SKES/TR/Empty y SKNMC/TR/Empty (controles) se cultivaron en las mismas condiciones. Las gráficas muestran que no hay diferencias significativas entre las células tratadas en ausencia o presencia de doxiciclina (ns: no significativo).

Para estudiar si el efecto de SPRY1 sobre la inhibición de la proliferación de las células de sarcoma de Ewing era citotóxico o citoestático, se realizaron estudios de ciclo celular. Para ello, se analizaron células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 no sincronizadas mediante citometría de flujo, cultivadas en ausencia o presencia de doxiciclina (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 72 horas. Como podemos observar en la **Figura 18A**, la re-expresión de SPRY1 produjo un ligero incremento en el porcentaje de células en la fase G1 del ciclo celular que se asoció a una reducción en el porcentaje de células en la fase G2/M. Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, esta tendencia se observó en todos los experimentos realizados. Estos resultados sugieren que la inhibición de la proliferación celular en las células que re-expresan SPRY1 puede deberse, al menos parcialmente, a un efecto citoestático debido a una parada del ciclo celular en la fase G1.

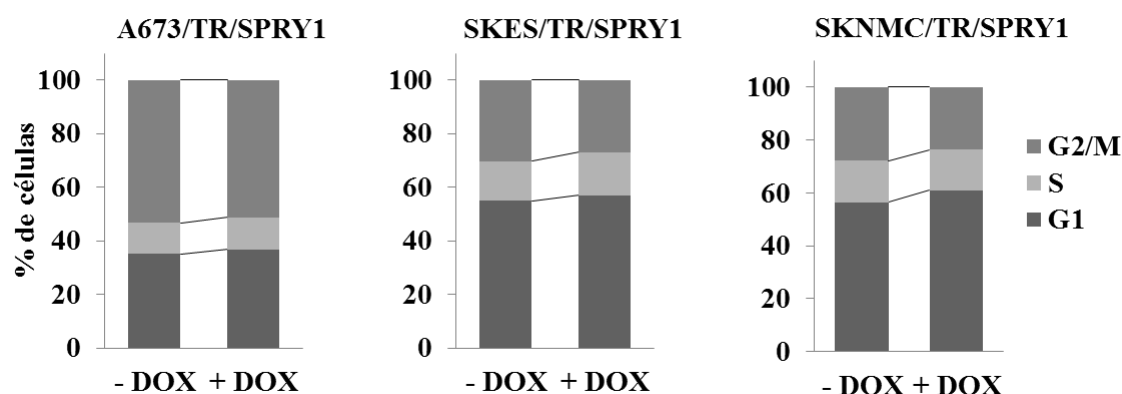


Figura 18. El efecto inhibitorio de la re-expresión de SPRY1 sobre la proliferación de células de Ewing se debe parcialmente a una parada del ciclo celular en fase G1. Se cultivaron células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 en ausencia o presencia de doxiciclina (- / + DOX; 1 $\mu\text{g/ml}$) durante 72 horas y se las tiñó con yoduro de propidio para analizar el ciclo celular mediante citometría de flujo. En la figura se observa que las células presentan una tendencia no significativa a acumularse en la fase G1. Las gráficas muestran un experimento representativo de los tres realizados.

SPRY1 inhibe el crecimiento de células a baja densidad y la formación de colonias en agar blando.

A continuación analizamos el efecto de la re-expresión de SPRY1 sobre otras características de las células tumorales, como son su capacidad para formar colonias en cultivos a baja densidad y en medio semisólido. Como se puede observar en la **Figura 19A**, la re-expresión de SPRY1 inhibió significativamente el crecimiento clonogénico en las tres líneas celulares de sarcoma de Ewing (entre un 20 y un 35% de inhibición). Por el contrario, no se observó ningún efecto sobre las células control (**Figura 19B**).

Posteriormente, analizamos el efecto de SPRY1 sobre la capacidad de las células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 para crecer independientemente de anclaje. Como se puede observar en la **Figura 20A**, la re-expresión de SPRY1 no generó un efecto sobre el número de colonias formadas, que resultó ser similar tanto en presencia como en ausencia de doxiciplina. Por el contrario, la re-expresión de SPRY1 provocó una disminución significativa en el tamaño de las colonias crecidas en agar blando: en la línea A673/TR/SPRY1 el tamaño medio de las colonias disminuyó un 78,4%, en SKES/TR/SPRY1 un 46,1% y en SKNMC/TR/SPRY1 un 69,7% (**Figura 20B**). Las tres líneas celulares control infectadas con el vector vacío no presentaron diferencias en la formación de colonias en medio semisólido tras el tratamiento con doxiciplina (**Figura 20C**).

Ambos resultados evidencian que la inducción de SPRY1 inhibe el crecimiento clonogénico y libre de anclaje en las tres líneas celulares de sarcoma de Ewing, ambas propiedades característica de las células transformadas, apuntando así a un posible papel onco-supresor de SPRY1.

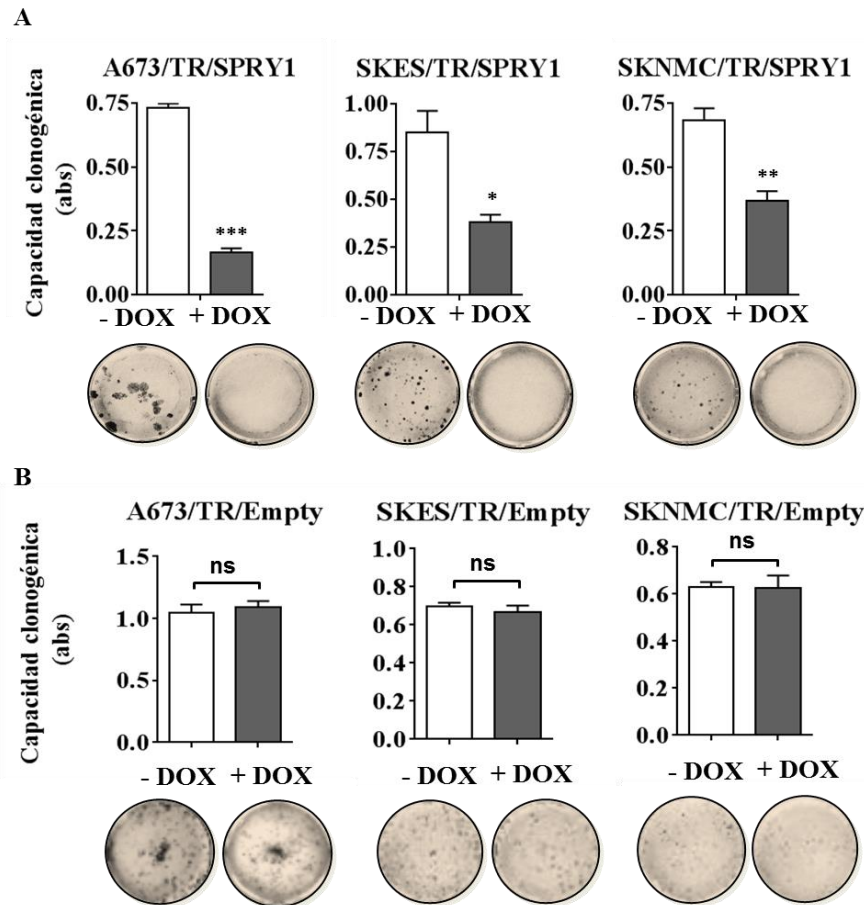


Figura 19. La re-expresión de SPRY1 inhibe el crecimiento clonogénico de las células de sarcoma de Ewing. A. Se cultivaron células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 en triplicados a baja densidad y se las mantuvo en ausencia o presencia de doxíciclina (DOX, 1 μ g/ml) durante 9 días. La formación de colonias se midió por tinción con cristal violeta. Las imágenes muestran pocillos representativos de los tres experimentos independientes realizados. Las gráficas muestran la cuantificación de la absorbancia medida al desteñir las células (un experimento representativo de los tres realizados, media \pm desviación estándar). La re-expresión de SPRY1 inhibe significativamente el crecimiento clonogénico en las tres líneas celulares estudiadas (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$). **B.** Células A673/TR/Empty, SKES/TR/Empty y SKNMC/TR/Empty utilizadas como controles y mantenidas en las mismas condiciones que en la Figura A. Las gráficas muestran como el tratamiento con doxíciclina no genera cambios significativos en el crecimiento clonogénico de estas células (un experimento representativo de los tres realizados, media \pm desviación estándar; ns: no significativo). Las imágenes muestran pocillos representativos de los tres experimentos independientes realizados.

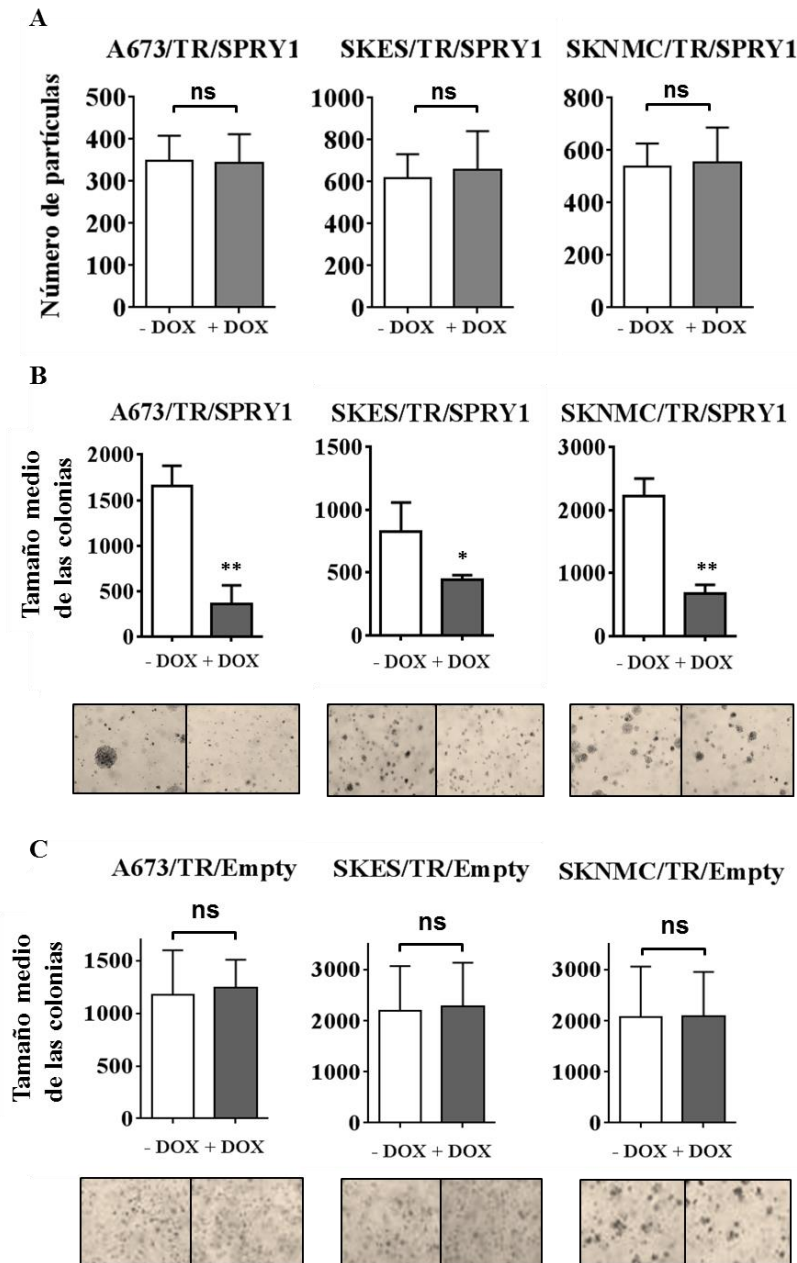


Figura 20. La re-expresión de SPRY1 inhibe el crecimiento independiente de anclaje en medio semisólidos de las células de sarcoma de Ewing. A. Las células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 se sembraron en triplicados en agar blando y se cultivaron en ausencia o presencia de doxiciplina (DOX, 1 μ g/ml) durante 25 días tras lo que fueron teñidas con cristal violeta. Las gráficas muestran el número de partículas (media \pm desviación estándar; ns: no significativo) donde se observa que no hay diferencias significativas tras el tratamiento en ausencia o presencia de doxiciplina. **B.** Las gráficas representan el tamaño medio por colonia tras 25 días (media \pm desviación estándar). La re-expresión de SPRY1 inhibe la formación de colonias en medio semisólido en las tres líneas celulares estudiadas (3 experimentos independientes; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). Las fotos fueron tomadas al final del experimento y muestran imágenes representativas de la formación de colonias. **C.** Células A673/TR/Empty, SKES/TR/Empty y SKNMC/TR/Empty utilizadas como controles y mantenidas en las mismas condiciones que en la Figura A. Las gráficas muestran como el tratamiento con doxiciplina no genera cambios significativos en el crecimiento libre de anclaje en estas células (un experimento representativo de los tres realizados, media \pm desviación estándar; ns: no significativo). Las imágenes muestran pocillos representativos de los tres experimentos independientes realizados.

La re-expresión de SPRY1 inhibe la migración de las células de sarcoma Ewing.

A continuación analizamos el efecto de la re-expresión de SPRY1 sobre la migración celular. Para ello primero estudiamos la capacidad de las células de sarcoma de Ewing de cerrar una herida artificial producida sobre una monocapa de células confluentes. Como se observa en la **Figura 21**, la re-expresión de SPRY1 inhibe la migración celular de las tres líneas de sarcoma de Ewing. Este efecto fue especialmente llamativo en las células SKNMC/TR/SPRY1, como se puede ver en el porcentaje de cierre de la herida: mientras que el cierre de la herida fue prácticamente total (98,6%) en las células SKNMC/TR/SPRY1 cultivadas en ausencia de doxiciclina, el porcentaje de cierre de herida fue sólo del 38,4% en presencia de doxiciclina.

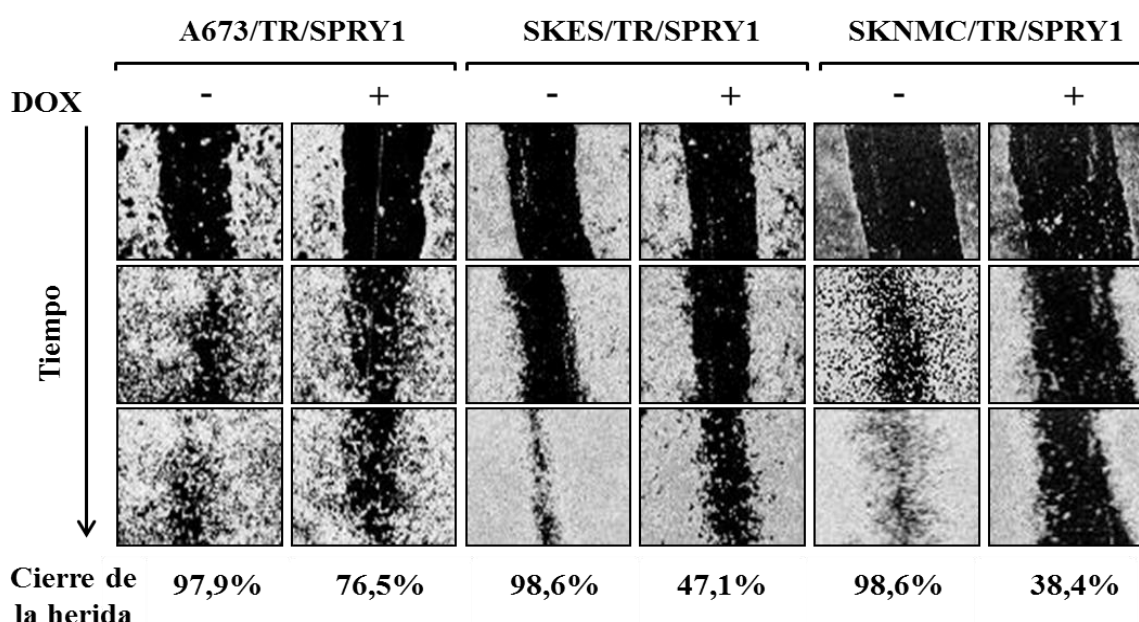


Figura 21. La re-expresión de SPRY1 inhibe la migración en monocapa de las células de sarcoma de Ewing. Se sembraron células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 por triplicado y se las mantuvo en ausencia o presencia de doxiciclina (DOX, 1 µg/ml) durante 72 horas. Posteriormente se realizó una “herida” raspando la monocapa de células con la punta de una micropipeta. Las fotos muestran el cierre de la herida a lo largo del tiempo en tres puntos: al principio, a la mitad y al final del experimento. Los porcentajes muestran el cierre de la herida relativo al final del experimento con respecto al tamaño de la herida inicial. Las fotos muestran un experimento representativo de los tres realizados.

Por otro lado, también analizamos el efecto de SPRY1 sobre la migración a través de una membrana porosa inducida por suero en las tres líneas celulares. Para ello, realizamos un ensayo de trans migración a través de membranas de polietileno tereftalato con poros de 8 µm, que permiten el paso de las células a través de la

membrana en respuesta a un estímulo quimioatrayente como el suero fetal bovino (**Figura 22A**). En la **Figura 22B** se observa como la re-expresión de SPRY1 produce una disminución en la migración celular inducida por suero en las tres líneas celulares, aunque una vez más, el efecto es más pronunciado en las células SKNMC/TR/SPRY1 (aproximadamente un 60% de inhibición de la migración). No se observaron diferencias en las células control, cultivadas en presencia o ausencia de doxiciclina (**Figura 22C**).

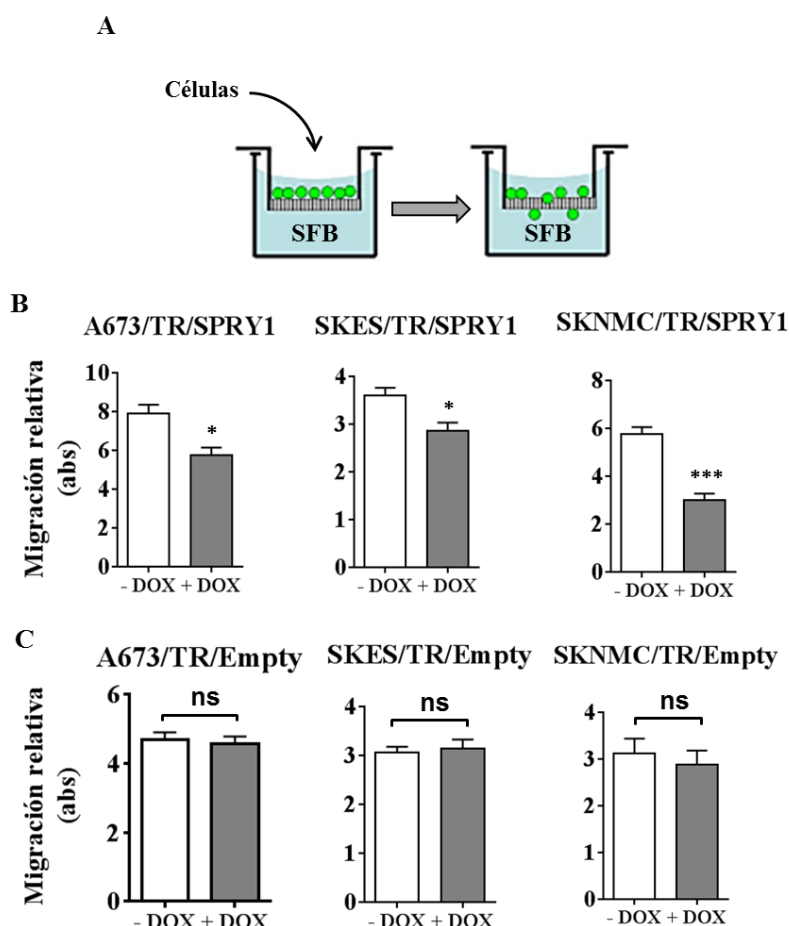


Figura 22. La re-expresión de SPRY1 inhibe la migración a través de membranas porosas en las células de sarcoma de Ewing. **A.** La figura muestra el esquema general del experimento, donde las células se siembran en la parte superior de la membrana porosa y migran a través de ella en respuesta a un estímulo quimioatrayente como el suero (SFB). **B.** Se incubaron células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 en ausencia o presencia de doxiciclina (DOX, 1 µg/ml) durante 48 horas para inducir la re-expresión de SPRY1. Posteriormente, se las deplecionó de suero durante otras 24 horas y se las colocó en el compartimento superior de una membrana porosa. En el compartimento inferior se añadió medio SFB al 10% y se les permitió migrar a través de la membrana porosa durante 6 horas. Las células que migraron fueron cuantificadas por tinción con cristal violeta. La figura muestra la media \pm desviación estándar de dos experimentos realizados en triplicado. Las gráficas muestran datos en unidades arbitrarias de absorbancia (abs) (* $P < 0,05$; *** $P < 0,005$). **C.** Células A673/TR/Empty, SKES/TR/Empty y SKNMC/TR/Empty utilizadas como control y mantenidas en las mismas condiciones que la Figura B. Las gráficas muestran como el tratamiento con doxiciclina no tiene un efecto significativo sobre la migración de estas células control. La figura muestra la media \pm desviación estándar de dos experimentos realizados en triplicado. Las gráficas muestran datos en unidades arbitrarias de absorbancia (abs) (ns: no significativo).

La re-expresión de SPRY1 produce cambios morfológicos en las células de sarcoma de Ewing.

Para analizar si el efecto de la re-expresión de SPRY1 sobre las características migratorias de las células de sarcoma de Ewing tenía su origen en un cambio de la morfología celular, realizamos un estudio del citoesqueleto empleando anticuerpos específicos: anti-vimentina, que se une a una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto y anti-faloidina, que se une específicamente a los microfilamentos de actina.

En esta ocasión, los experimentos se llevaron a cabo en la línea celular SKNMC/TR/SPRY1 dado que, como hemos mostrado anteriormente, el efecto de la re-expresión de SPRY1 sobre sus capacidades migratorias fue más acusado en esta línea celular. Como se observa en la **Figura 23A**, las células SKNMC/TR/SPRY1 cultivadas en ausencia de doxiciclina presentaban una forma redondeada, exceptuando la zona donde los filamentos están polarizados, atendiendo a la morfología propia de células con capacidad migratoria. Sin embargo, el tratamiento con doxiciclina (1 µg/ml) cambia significativamente la morfología de las células, de tal manera que estas aparecieron menos redondeadas, con el citoplasma más extendido y con menos polarización (**Figura 23A**). Estos cambios morfológicos fueron cuantificados y, como se muestra en la **Figura 23B**, la re-expresión de SPRY1 genera una pérdida significativa de la circularidad.

En paralelo se realizó el mismo análisis con las células control (SKNMC/TR/Empty) en presencia o ausencia de doxiciclina y se comprobó que no existían diferencias significativas entre ambos tratamientos (**Figura 23A, B**), por lo que se puede concluir que los cambios morfológicos observados son consecuencia de la re-expresión de SPRY1.

Estos resultados, tomados en su conjunto, indican que la re-expresión de SPRY1 inhibe las características transformadas de las células de sarcoma de Ewing: SPRY1 inhibe la proliferación, el crecimiento clonogénico, la migración y la capacidad invasiva de las células, así como el crecimiento libre de anclaje en las líneas celulares de sarcoma de Ewing.

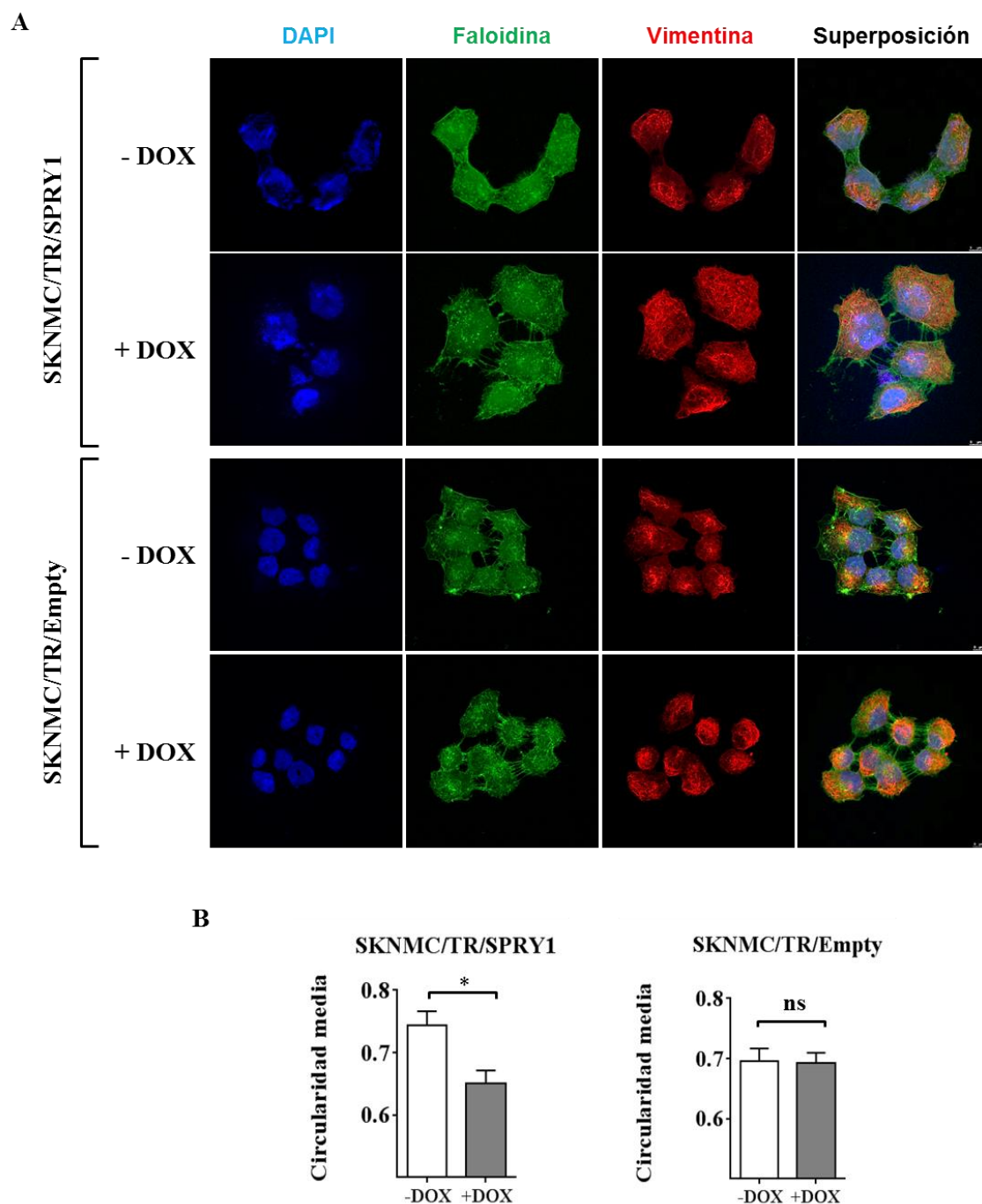


Figura 23. La re-expresión de SPRY1 genera cambios morfológicos en las células de sarcoma de Ewing. Células SKNMC/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/Empty se trataron en ausencia o presencia de doxiciclina (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 72 horas. Posteriormente se marcaron los componentes del citoesqueleto con anticuerpos fluorescentes para vimentina (rojo) y faloidina (verde) y los núcleos con DAPI (azul). **A.** Las imágenes muestran fotos representativas de tres experimentos independientes realizados. **B.** Las gráficas muestran la circularidad media de las células de las imágenes analizadas (media \pm desviación estándar; ns: no significativo; $*P < 0,05$).

4.3. Efecto de SPRY1 sobre la vía de señalización de las MAPKs

Tal y como se ha comentado en la introducción, SPRY es un regulador negativo de la vía de señalización de MAPK, una de las vías más relevantes implicadas en proliferación. En particular, SPRY1 es un inhibidor de la activación de esta ruta mediada por FGFb (Casci *et al.* 1999, Minowada *et al.* 1999, Hanafusa *et al.* 2002, Assinder *et al.* 2015). Por ello, decidimos analizar el efecto de la re-expresión de SPRY1 sobre la ruta de las MAPKs, inducida por suero o FGFb en células de sarcoma de Ewing.

La re-expresión de SPRY1 inhibe la vía de señalización Ras/MAPK/ERK en las células de sarcoma de Ewing.

En primer lugar analizamos el efecto de la re-expresión de SPRY1 sobre la activación de ERK mediada por suero. Para ello, mantuvimos las células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 a baja concentración de suero (1% SFB) durante 72 horas y posteriormente estimulamos las células durante 15 minutos con medio al 10% de suero. En la **Figura 24** podemos observar que las células tratadas con doxiciclina, y que por tanto re-expresaban SPRY1, experimentaron una inhibición importante de los niveles de fosforilación de ERK: por un lado, en condiciones de niveles bajos de suero (1% SFB) se observó una inhibición de la fosforilación de ERK que variaba entre el 70% en SKNMC/TR/SPRY1 y el 45% en A673/TR/SPRY1 con respecto a las células no tratadas con doxiciclina. Tras la estimulación de las células con 10% de suero durante 15 minutos se observó una inhibición que varía entre el 50% en SKES/TR/SPRY1 y el 35% en SKNMC/TR/SPRY1 con respecto a las mismas células cultivadas en ausencia de doxiciclina.

También estudiamos el efecto de la re-expresión de SPRY1 sobre la activación de ERK mediada por FGFb, ya que FGFb es un factor de crecimiento que genera la activación de Ras y en consecuencia de ERK (Ornitz and Itoh 2015). En la **Figura 24** se puede observar como al estimular las células con FGFb, obtuvimos un aumento de los niveles de fosforilación de ERK, especialmente en las células SKES/TR/SPRY1. Además, la

re-expresión de SPRY1 generó la inhibición de la fosforilación de ERK. Este efecto es similar al descrito anteriormente con la estimulación por suero.

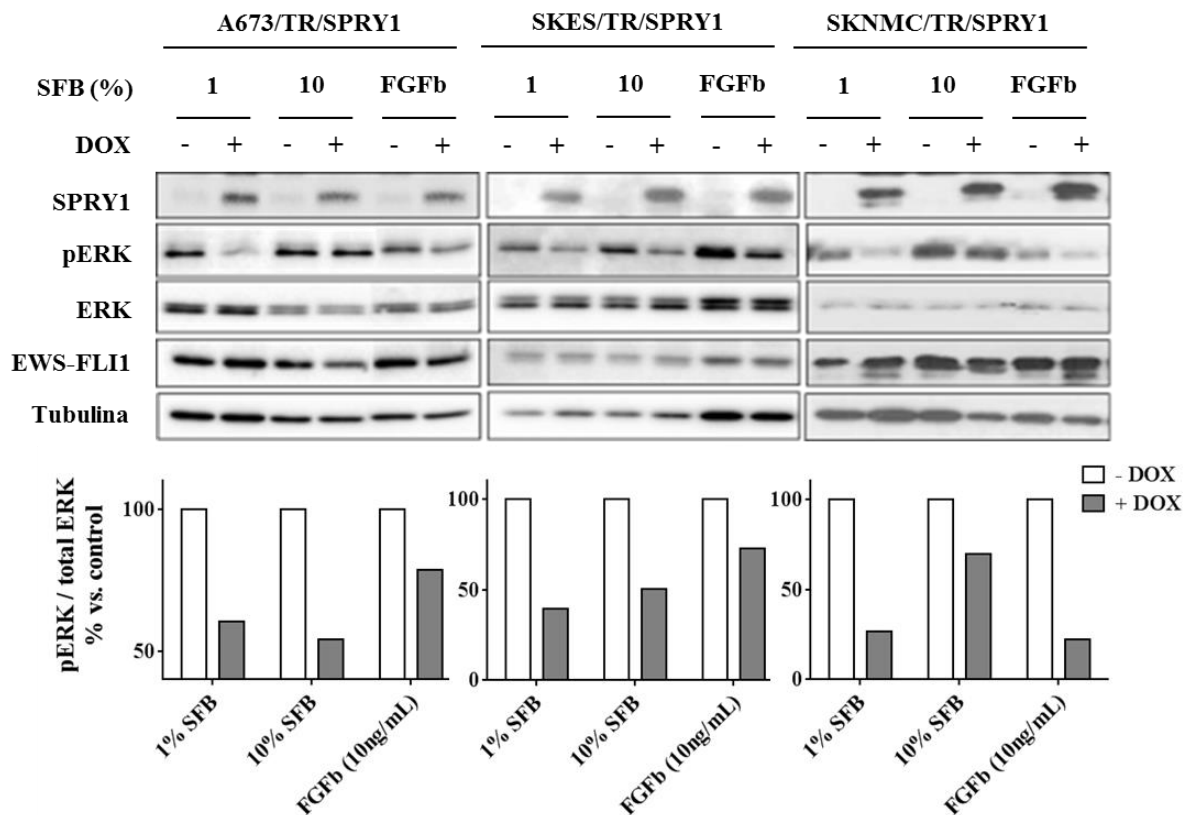


Figura 24. SPRY1 inhibe la vía de señalización de MAPK en células de sarcoma de Ewing. Las células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 se incubaron en ausencia o presencia de doxyciclina (DOX, 1 μ g/ml) durante 48 horas para inducir la expresión de la proteína SPRY1. Después se las deplecionó de suero durante 24 horas (1% SFB) y finalmente se las estimuló con SFB al 10% o FGFB (FGFB: factor de crecimiento fibroblástico básico) (10 ng/ml) durante 15 minutos. La presencia de las proteínas SPRY1, ERK fosforilado (pERK; Thr202/Tyr204), ERK y EWS-FLI1 se detectó con anticuerpos específicos. Se utilizó tubulina como control de carga. La re-expresión de SPRY1 inhibe la fosforilación de ERK inducida por FGFB o suero (SFB) en las tres líneas celulares. Las gráficas muestran las densitometrías correspondientes a las bandas de los western blots para la relación ERK fosforilado/ERKtotal. Las células cultivadas en ausencia de doxyciclina se emplearon como control. La figura muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados.

Estos resultados sugieren que la inhibición de SPRY1 en células de Ewing puede ser necesaria para mantener activada de forma constitutiva la ruta Ras/MAPK/ERK. Dado que la activación de la ruta de MAPK es esencial para el desarrollo del fenotipo maligno, la re-expresión de SPRY1 actuaría inhibiendo esta ruta y por tanto, limitando la transformación neoplásica de las células de sarcoma de Ewing.

El efecto de la re-expresión de SPRY1 es similar al de los inhibidores de FGFR en células de sarcoma de Ewing.

Como hemos observado anteriormente, la re-expresión de SPRY1 inhibió la fosforilación de ERK activada por FGFb. Además, se ha descrito que el FGFb induce la proliferación de varias líneas celulares de Ewing, como A673, SKNMC y POE (Grunewald *et al.* 2015). Esto nos indujo a pensar que esta ruta podía ser relevante en la patogénesis del sarcoma de Ewing y, en consecuencia, ser una nueva diana terapéutica para el tratamiento de este tumor. Por ello decidimos estudiar el efecto de inhibidores de FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*) sobre las células de sarcoma de Ewing.

Para ello testamos el efecto de 4 inhibidores de FGFR, PD173074 (PD-74), NVP-BGJ398 (BG-98), SU5402 (SU54) y PD166866 (PD-66) sobre la proliferación de 5 líneas celulares de sarcoma de Ewing (A673, SKES, SKNMC, POE y RDES) y una línea celular de fibroblastos normales que utilizamos como control (IMR90). En la **Figura 25** se observa como el empleo de estos inhibidores reduce la proliferación de todas las líneas celulares de sarcoma de Ewing, mientras que no se afecta la proliferación de los fibroblastos normales.

En la **Tabla 14** se muestran los valores de las IC50s de cada inhibidor para cada una de las líneas celulares estudiadas. De acuerdo con estos cálculos, PD-74 es uno de los inhibidores con un efecto más potente.

A continuación analizamos también el efecto de estos inhibidores de FGFR sobre el crecimiento clonogénico en tres líneas celulares de Ewing (A673, SKNMC y POE). En la **Figura 26** observamos como los 4 inhibidores de FGFR son capaces de inhibir el crecimiento a baja densidad de las tres células de sarcoma de Ewing estudiadas, y especialmente en la línea celular POE.

◆ BG-98 ○ PD-74
■ PD-66 □ SU-54

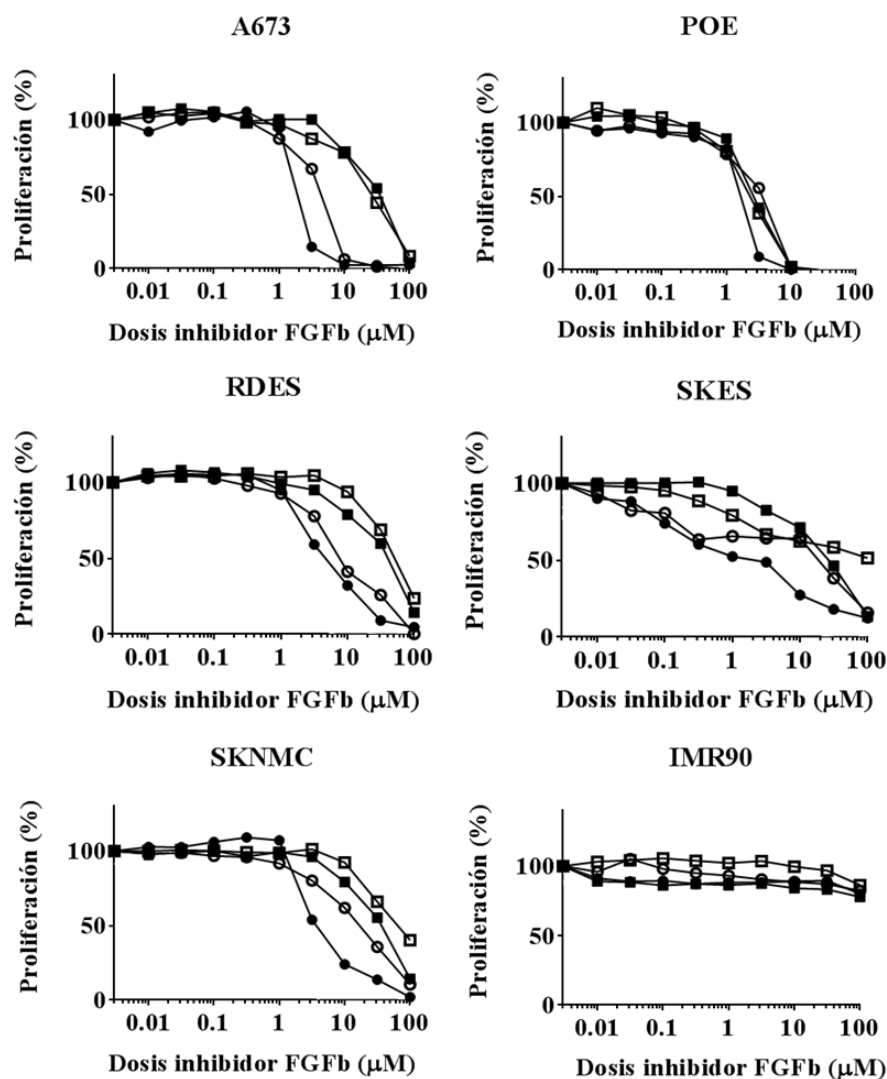


Figura 25. Los inhibidores de FGFR inhiben la proliferación celular de las líneas de sarcoma de Ewing. Cuatro inhibidores de FGFR (PD173074 [PD-74], PD166866 [PD-66], SU5402 [SU54] y NVP-BGJ398 [BG-98]) inhiben la proliferación de las células de sarcoma de Ewing A673, SKNMC, POE, RDES y SKES *in vitro* de forma dependiente de dosis. Las células normales (fibroblastos IMR90) no presentan inhibición de la proliferación con ninguno de los inhibidores utilizados. PD-74 y BG-98 son los inhibidores de FGFR más efectivos en cuatro de las 5 células de sarcoma de Ewing testadas. Las células se cultivaron en medio al 10% de SFB y la proliferación celular se midió a las 72 horas utilizando el ensayo de resazurina.

Tabla 14. Resultados de las IC50 (media \pm desviación estándar) en las líneas celulares tratadas con cuatro inhibidores de FGFR diferentes: PD173074 (PD-74), PD166866 (PD-66), SU5402 (SU54), and NVP-BGJ398 (BG-98).

Línea celular	IC50 (μ M)			
	PD-74	PD-66	BG-98	SU54
A673	4,03 \pm 1,04	29,8 \pm 1,07	2,03 \pm 1,07	24,38 \pm 1,04
SKNMC	15,44 \pm 1,47	32,5 \pm 1,04	4,38 \pm 1,09	65,88 \pm 1,04
POE	3,29 \pm 1,11	2,33 \pm 1,04	1,56 \pm 1,08	1,53 \pm 1,11
SKES	23,33 \pm 1,03	29,09 \pm 3,62	4,58 \pm 1,65	91,22 \pm 8,54
RDES	8,69 \pm 1,07	34,95 \pm 1,07	5,11 \pm 1,07	50,34 \pm 1,04
IMR90	-	-	-	-

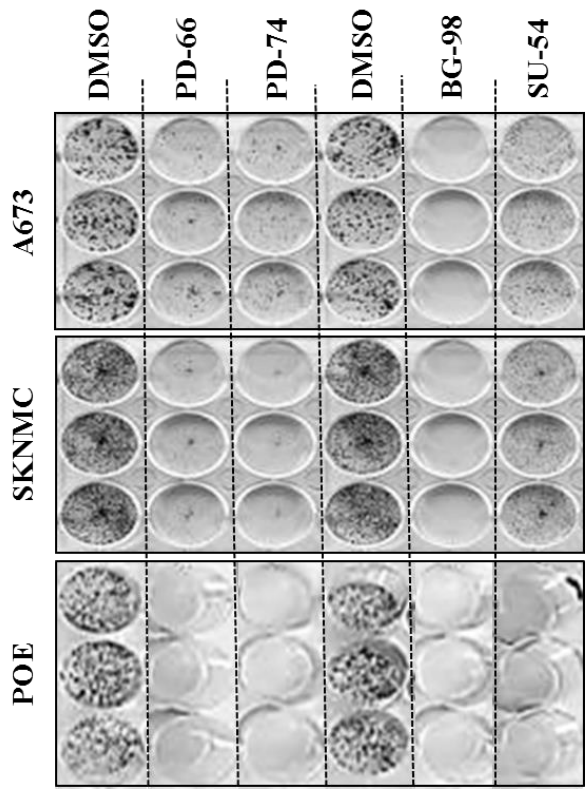


Figura 26. Los inhibidores de FGFR inhiben el crecimiento clonogénico de las líneas de sarcoma de Ewing. Los cuatro inhibidores testados, PD173074 (PD-74), PD166866 (PD-66), SU5402 (SU54) y NVP-BGJ398 (BG-98) inhiben el crecimiento clonogénico de las líneas A673, SKNMC y POE de sarcoma de Ewing *in vitro*. Las células se mantuvieron con medio al 5% de SFB durante 10-12 días en presencia de los inhibidores indicados a las concentraciones de sus IC50s y finalmente se tiñeron con cristal violeta. Las imágenes corresponden a fotografías representativas obtenidas el día final del experimento.

Análisis del efecto combinado de la re-expresión de SPRY1 y los inhibidores de FGFR sobre la proliferación celular.

Una vez analizado el efecto de los diferentes inhibidores de FGFR sobre las células de sarcoma de Ewing, decidimos estudiar el efecto de la inhibición de FGFR en combinación con la re-expresión de SPRY1 con el objetivo de determinar si ambos actuaban o no de forma sinérgica. Estos experimentos nos podrían ayudar a comprender si SPRY1 y los inhibidores de FGFR estaban actuando sobre la misma ruta.

Para ello, indujimos la re-expresión de SPRY1 en las tres líneas de sarcoma de Ewing A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 mediante la adición de doxiciclina (1 µg/ml) durante 72 horas y posteriormente tratamos las células con FGFb (10 ng/ml) para estimular su proliferación, el inhibidor de FGFR PD-74 (5 µM) o una combinación de ambos. Como se puede observar en la **Figura 27**, la re-expresión de SPRY1 inhibe significativamente la proliferación inducida por FGFb en las tres líneas celulares estudiadas. Estos resultados son consistentes con los descritos en la **Figura 24**, donde se observa que la re-expresión de SPRY1 inhibe significativamente la fosforilación de ERK en respuesta a FGFb. Además, esto sugiere que la inhibición de la fosforilación de ERK mediada por la re-expresión de SPRY1 contribuiría a la inhibición de la proliferación observada en las células de sarcoma de Ewing.

Por otro lado, el tratamiento con PD-74 inhibe la proliferación inducida por FGFb en las tres líneas celulares. En el caso de las células SKES/TR/SPRY1 el efecto de PD-74 sobre la proliferación celular es mayor que el de la re-expresión de SPRY1.

Al analizar el efecto conjunto de la re-expresión de SPRY1 y el tratamiento con PD-74 sobre la proliferación celular vemos como en las líneas celulares A673/TR/SPRY1 y SKES/TR/SPRY1, PD-74 no produce una mayor inhibición de la proliferación, lo que podría indicar que SPRY1 y PD-74 estuviesen actuando sobre la misma vía y por ello no se observa un efecto aditivo. Sin embargo, en la línea SKNMC/TR/SPRY1, la re-expresión de SPRY1 genera una inhibición mayor sobre la proliferación celular que el tratamiento con PD-74 sólo, lo que podría indicar que en estas células la inhibición estuviese ocurriendo por mecanismos parcialmente diferentes.

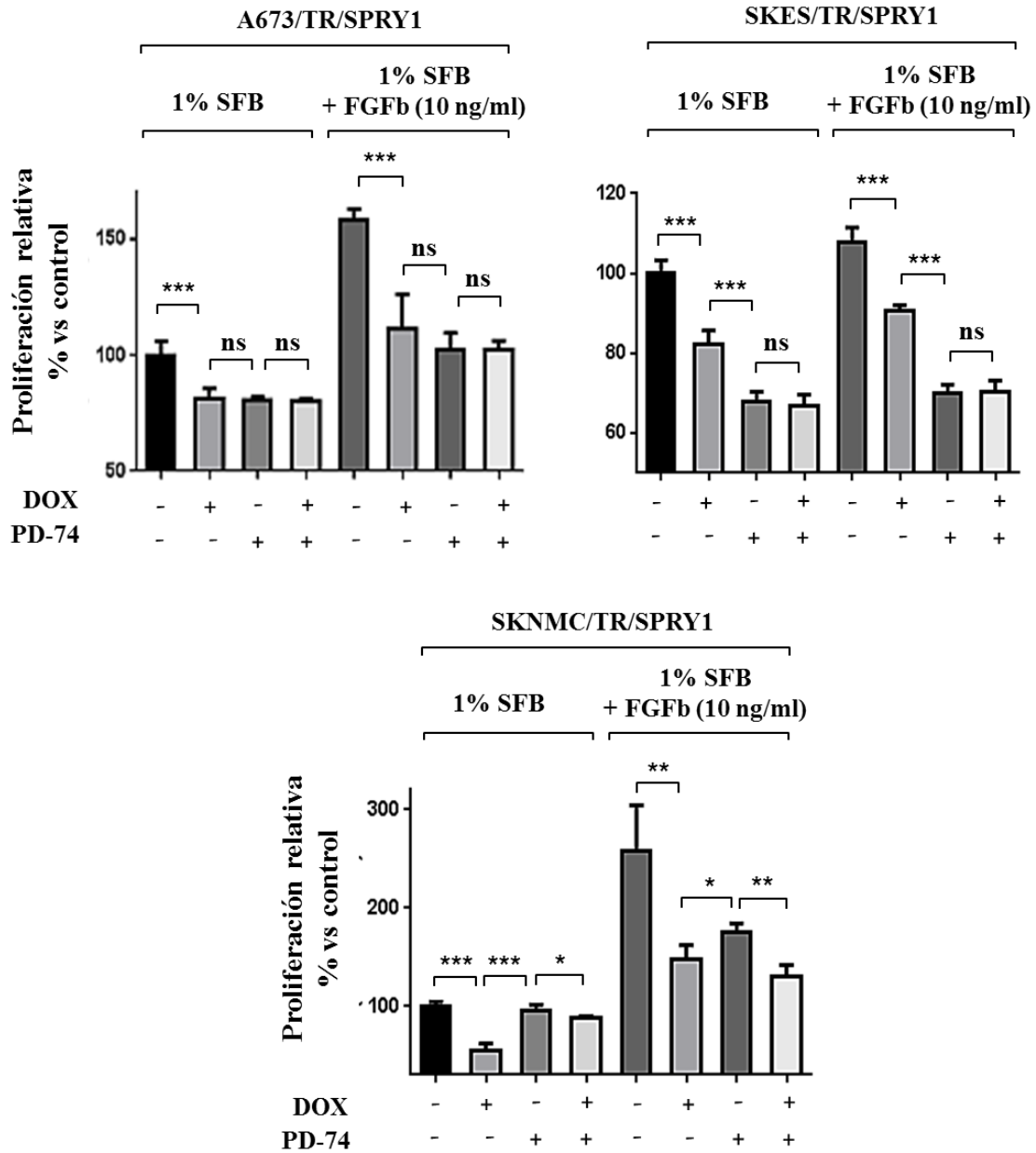


Figura 27. Análisis del efecto combinado de la re-expresión de SPRY1 y el inhibidor de FGFR PD-74 sobre la proliferación celular. Se incubaron células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 en ausencia o presencia de doxiciplina (DOX, 1 μ g/ml) para inducir la expresión de la proteína de SPRY1. Además, se las cultivó con SFB al 1%, FGFb (10 ng/ml), PD173074 (PD-74, 5 μ M) o una combinación de FGFb y PD-74. A las 72 horas se midió la proliferación utilizando el ensayo de resazurina. Las gráficas muestran un experimento independiente (media \pm desviación estándar) de los tres realizados. La re-expresión de SPRY1 y el tratamiento con PD-74 inhiben la proliferación celular inducido por FGFb (* $P < 0,05$, ** $P < 0,005$, *** $P < 0,001$; ns = no significativo).

Con el objetivo de determinar si este efecto observado con PD-74 era común a otros inhibidores de FGFR, se analizó también el efecto de los inhibidores de FGFR BG-98, PD-66 y SU54 sobre la proliferación celular. De forma general, se puede observar en la **Figura 28** que dos de los inhibidores de FGFR (BG-98 y PD-66) inhibieron significativamente la proliferación de estas líneas celulares, más allá de la inhibición generada por la re-expresión de SPRY1 sola. En la misma **Figura 28** podemos observar también el efecto de la re-expresión de SPRY1 en combinación con la adición de los inhibidores. Los inhibidores BG-98 y PD-66 inhiben la proliferación celular en ausencia de doxiciclina más allá del efecto que ejerce la re-expresión de SPRY1 solo. Por el contrario, el efecto del inhibidor SU54 es menos potente. A pesar de que estos experimentos se habían realizado en condiciones normales de suero (10% SFB) y sin estimulación por FGFb como en los experimentos anteriores en los que se empleaba PD-74 (**Figura 27**), sí se observa una cierta concordancia en los resultados entre los diferentes inhibidores: la re-expresión de SPRY1 junto con el tratamiento con cualquiera de los inhibidores no genera una mayor inhibición de la proliferación de las células testadas, lo que podría indicar que estuviesen actuando sobre los mismos mecanismos o que se hubiese alcanzado una saturación de la inhibición de los mismos.

Es interesante mencionar que en algunos casos los resultados fueron célula e inhibidor dependientes. Por ejemplo, como hemos comentado anteriormente, el inhibidor SU54 parece no tener un efecto sobre la inhibición de la proliferación en las células SKES/TR/SPRY1, dado que la inhibición de la proliferación celular es igual al de la re-expresión de SPRY1 a diferencia de las otras dos líneas de sarcoma de Ewing testadas. En estas células (A673/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1), la adición de SU54 inhibe la proliferación celular más allá del efecto de la re-expresión de SPRY1 solo. Esto sugiere que algunos inhibidores como BG-98 o PD-66 podrían estar actuando de forma similar en todas las líneas celulares testadas, mientras que el inhibidor SU54 podría estar actuando mediante mecanismos diferentes dependiendo de la línea celular.

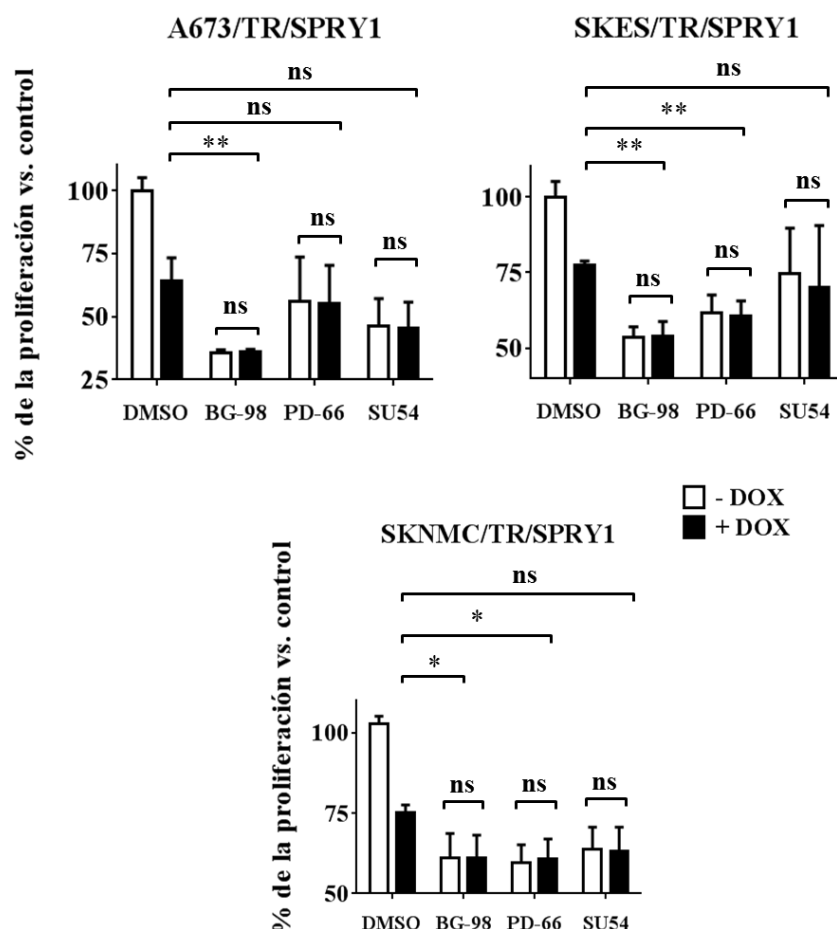


Figura 28. Análisis del efecto combinado de la re-expresión de SPRY1 y los inhibidores de FGFR BG-98, PD-66 y SU54 sobre la proliferación celular. Se trataron células A673/TR/SPRY1, SKES/TR/SPRY1 y SKNMC/TR/SPRY1 en ausencia o presencia de doxiciplina (- / + DOX; 1 μ g/ml) junto con cada inhibidor (BG-98, PD-66 y SU54 a una concentración de 5 μ M cada uno) en condiciones normales de suero (10% SFB). En la gráfica se observa como SPRY1 inhibe la proliferación en todos los casos. Además, BG-98 y PD-66 generan una reducción aún mayor de la proliferación en ausencia de doxiciplina, mientras que el efecto del inhibidor SU54 es menos potente. La re-expresión de SPRY1 junto con el tratamiento con cualquiera de los inhibidores no genera una mayor inhibición de la proliferación de las células testadas. Las gráficas representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos diferentes (* $P < 0,05$, ** $P < 0,005$, ns = no significativo).

4.4. Potencial terapéutico de los inhibidores de FGFR en sarcoma de Ewing

A continuación, analizamos el efecto de la inhibición de FGFR sobre la formación de tumores en ratones inmunodeprimidos C.B17 SCID. Para ello se seleccionó el inhibidor

de FGFR PD-74 que, como pudimos ver en el apartado anterior, presentaba uno de los efectos más potentes en células de sarcoma de Ewing *in vitro*.

En primer lugar se empleó la línea celular POE para la formación de los xenotransplantes, dado que esta presentaba la mayor sensibilidad a este inhibidor en comparación con el resto de las líneas estudiadas (**Figura 25** y **Tabla 14**).

Los resultados de estos experimentos se muestran en la **Figura 29**. Como se puede observar en dicha figura, el tratamiento diario de los animales con una inyección intraperitoneal de 20 mg/Kg de PD-74 una vez el tumor fue detectable, inhibió significativamente el tamaño tumoral ($P = 0,004$).

Posteriormente se analizaron mediante inmunohistoquímica las muestras tumorales procedentes de los animales tratados con vehículo y PD-74 para determinar el efecto del inhibidor sobre la proliferación celular y la apoptosis. Como se puede observar en la **Figura 30**, los tumores procedentes de ratones que habían sido tratados con PD-74 presentaron un menor número de mitosis por campo (reducción del 50%; $P = 0,001$). Este resultado correlacionó con el número de células positivas para el marcador de proliferación Ki-67, que experimentó una reducción significativa en los tumores procedentes de ratones tratados con PD-74 ($P < 0,01$). Por otro lado, se observó un incremento significativo en el número de células apoptóticas (células *cleaved-caspasa-3* positivas) del 40% ($P = 0,001$) con respecto a los ratones tratados con el vehículo (DMSO).

Finalmente y para confirmar si PD-74 tenía también un efecto antitumoral *in vivo* en otras líneas celulares de sarcoma de Ewing, se realizaron experimentos *in vivo* utilizando células SKES, que habían demostrado una menor sensibilidad a PD-74 en los experimentos previos (**Figura 25** y **Tabla 14**). En este caso también estudiamos si el efecto de PD-74 era dependiente de la dosis. Para ello se emplearon tres dosis diferentes del inhibidor de FGFR (5, 10 y 20 mg/Kg).

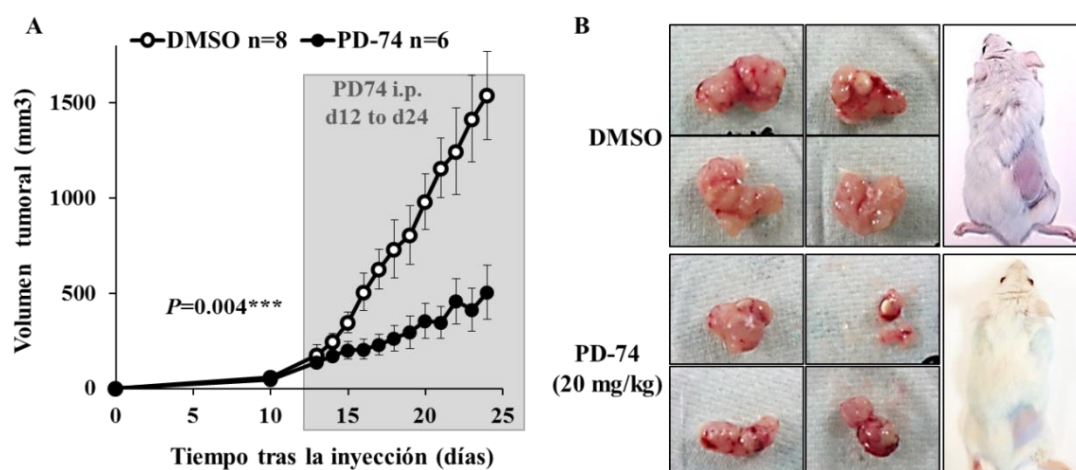


Figura 29. El inhibidor de FGFR PD-74 inhibe el crecimiento tumoral de xenotransplantes de las células POE de sarcoma de Ewing. A. Las células POE fueron inyectadas en ratones C.B17/SCID que se dividieron en 2 grupos aleatoriamente una vez el tumor había alcanzado un tamaño de 150 mm³. A partir de este momento cada grupo fue tratado intra-peritonealmente una vez al día con PD-74 (20 mg/Kg) o el vehículo (DMSO). La gráfica muestra la evolución del volumen tumoral (media \pm error estándar) de 6-8 animales por grupo a lo largo del tiempo. El recuadro gris muestra el periodo durante el que los animales fueron sometidos al tratamiento. El tratamiento con PD-74 inhibe significativamente el crecimiento del tumor ($P = 0,004$). B. Fotografías representativas de 4 tumores de cada grupo extraídos al final del experimento y un ratón representativo de cada grupo donde se puede observar la variación del tamaño de los tumores.

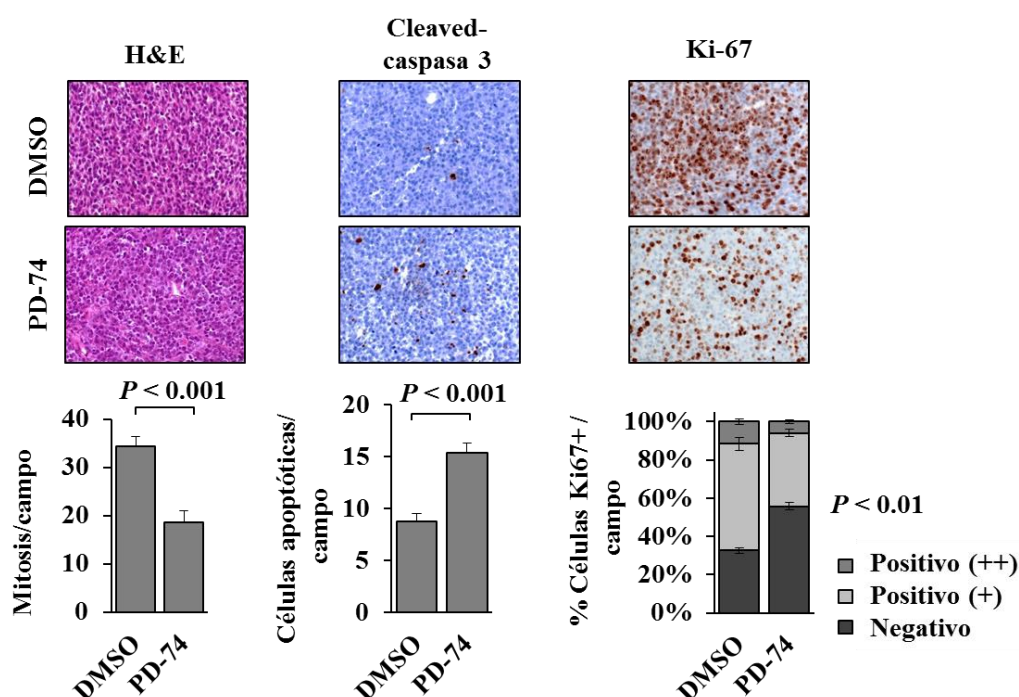


Figura 30. Estudios inmunohistoquímicos de los tumores procedentes de los experimentos *in vivo* de xenotransplantes con células POE tratadas con el inhibidor de FGFR PD-74. Las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina/eosina (H&E) para observar las mitosis, o se incubaron con anticuerpos anti-cleaved-caspasa 3 para detectar apoptosis y anti-Ki-67 para detectar proliferación. Las gráficas muestran como el tratamiento con PD-74 reduce el número de mitosis por campo ($P = 0,001$) e incrementa el número de células apoptóticas por campo ($P = 0,001$). La tinción con Ki-67 y la gráfica muestra una reducción en el porcentaje de células Ki67-positivas (++ o +) en los tumores tratados con PD-74 ($P < 0,01$).

Como podemos observar en la **Figura 31A y B**, PD-74 inhibió el crecimiento tumoral de las células SKES y este efecto resultó ser dependiente de la dosis: la dosis de 20 mg/Kg es capaz de inhibir de forma significativa dicho crecimiento (inhibición del 70,7% del crecimiento al final del experimento; $P = 0,005$).

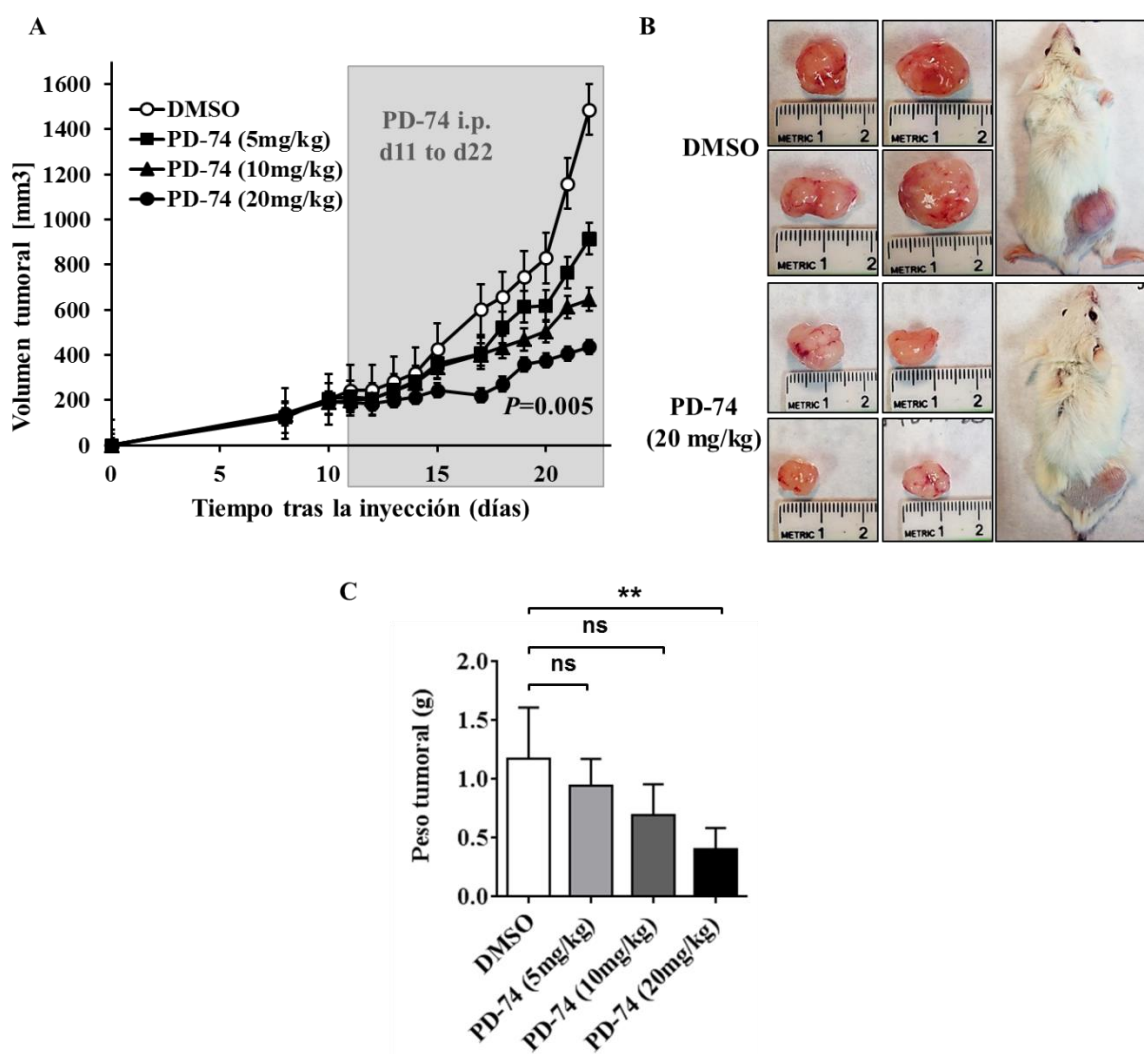


Figura 31. El inhibidor de FGFR PD-74 inhibe el crecimiento tumoral de xenotransplantes de células SKES de sarcoma de Ewing de forma dependiente de dosis. **A.** Las células SKES fueron inyectadas en ratones C.B17/SCID que se dividieron en 4 grupos aleatoriamente ($n = 6$ en cada grupo) una vez el tumor había alcanzado un tamaño de 200 mm³. A partir de este momento cada grupo fue tratado intra-peritonealmente una vez al día con PD-74 a las dosis indicadas o el vehículo (DMSO) (recuadro gris). La gráfica muestra la evolución del volumen tumoral (media \pm error estándar) de 6 animales por grupo en el tiempo. El tratamiento con PD-74 inhibe significativamente el crecimiento del tumor a la dosis de 20 mg/Kg ($P = 0,005$) en xenotransplantes de sarcoma de Ewing. **B.** Las imágenes muestran 4 fotos representativas de cada grupo (DMSO o PD-74 20 mg/Kg) de los tumores extraídos y un ratón representativo de cada grupo donde se puede observar el tamaño real de los tumores en centímetros. **C.** La gráfica muestra como el peso de los tumores extraídos disminuye significativamente al aumentar la dosis de tratamiento con PD-74 (** $P < 0,004$, media \pm desviación estándar).

También se analizó el peso de los tumores extraídos tras el sacrificio del animal y se observó que, en concordancia con los resultados de progresión del tamaño tumoral, se obtuvo una disminución significativa del peso de los tumores procedentes de animales tratados con la dosis más alta de PD-74 (20 mg/Kg) al compararlo con los tumores procedentes de los animales no tratados (control, DMSO) (**Figura 31C**).

En la **Figura 32** podemos ver que los tumores de los animales tratados con PD-74 (20 mg/Kg) presentaron una reducción significativa del número de mitosis por campo ($P = 0,01$). Además, se detectó una disminución significativa del número de células positivas para la tinción de Ki-67 (medida de la proliferación) en los tumores tratados con PD-74 ($P < 0,01$) y un aumento significativo en el número de células apoptóticas por campo ($P < 0,001$).

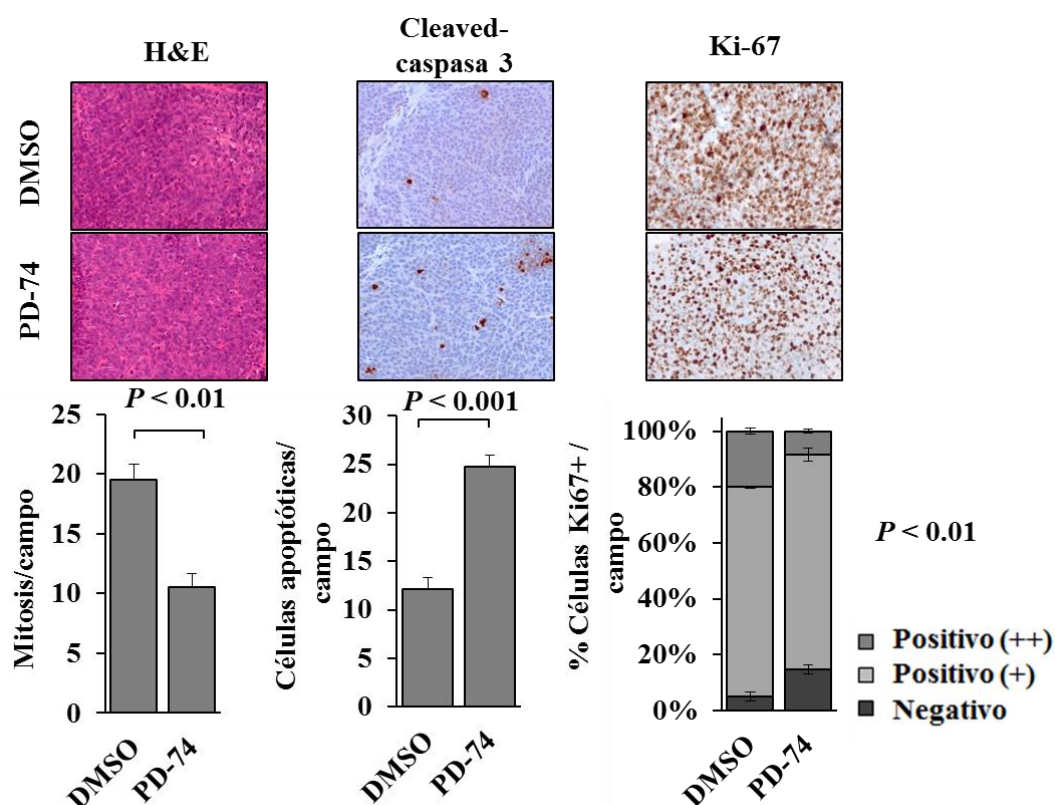


Figura 32. Estudios inmunohistoquímicos de los tumores procedentes de los experimentos *in vivo* de xenotransplantes con células SKES tratadas con el inhibidor de FGFR PD-74. Las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina/eosina (H&E) para observar las mitosis, o se incubaron con anticuerpos anti-*cleaved*-caspasa 3 para detectar apoptosis y anti-Ki-67 para detectar proliferación. Las gráficas muestran como el tratamiento con PD-74 a 20 mg/Kg reduce el número de mitosis por campo ($P = 0,01$) e incrementa el número de células apoptóticas por campo ($P = 0,001$). La tinción con Ki-67 y la gráfica muestra una reducción en el porcentaje de células Ki67-positivas (++ o +) en los tumores tratados con PD-74 ($P < 0,01$).

Durante todo el experimento se monitorizó a los animales diariamente para detectar la aparición de signos de toxicidad en el tratamiento con PD-74. Todos los animales tratados se mantuvieron en condiciones óptimas y la evolución de su peso no se vio afectada por el tratamiento, como podemos ver en la **Figura 33**.

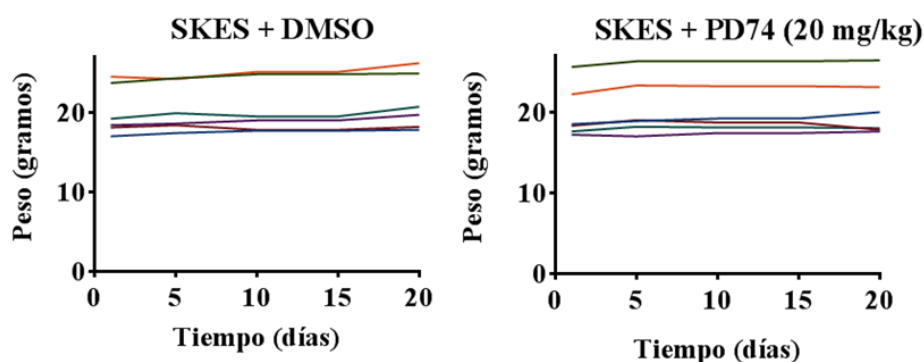


Figura 33. El tratamiento con el inhibidor PD-74 no genera toxicidad en los animales. La gráfica muestra como el peso corporal de los animales se mantuvo a lo largo del experimento en comparación con los animales tratados con vehículo. Cada línea representa a un animal.

4.5. SPRY1 podría ser un factor pronóstico en sarcoma de Ewing

Los resultados mostrados en esta Tesis sugieren que la inhibición de SPRY1 es uno de los factores que puede contribuir a mantener la vía de señalización Ras/MAPK/ERK activada constitutivamente en respuesta a estímulos externos como FGFb. En este contexto, los niveles de SPRY1 podrían correlacionar con el grado de activación de la ruta, lo que podrían tener consecuencias en la agresividad tumoral. Por ello se decidió estudiar si los niveles de expresión de SPRY1 *in situ* podían estar relacionados con el pronóstico de los pacientes de sarcoma de Ewing.

SPRY1 presenta niveles bajos de expresión, pero variables, en tumores de Ewing con respecto a otras cohortes de tumores sólidos.

Hemos mostrado previamente un análisis de los niveles de expresión de SPRY1 en una pequeña serie de tumores de Ewing primarios (**Figura 9**). Sin embargo, para poder

sacar conclusiones acerca de la utilidad pronóstica de un marcador determinado, en este caso SPRY1, es necesario analizar un número mayor de casos.

En primer lugar realizamos un análisis comparativo de los niveles de expresión de SPRY1 en una cohorte de 117 muestras de sarcoma de Ewing (Postel-Vinay *et al.* 2012) con respecto a otros 24 tipos diferentes de tumores sólidos. En la **Figura 34** se observa como las muestras de sarcoma de Ewing son unas de las que presentan los niveles más bajos de expresión de SPRY1, lo cual concuerda con los resultados que habíamos obtenido en una serie mucho más pequeña de sarcomas de Ewing (**Figura 9**). Sin embargo, en esta ocasión los niveles de expresión demostraron ser bastante variables. Dado que esta muestra es mucho mayor, concluimos que los niveles de expresión en sarcomas de Ewing, aunque bajos, presentaban también cierta variabilidad, lo cual podría tener implicaciones pronósticas.

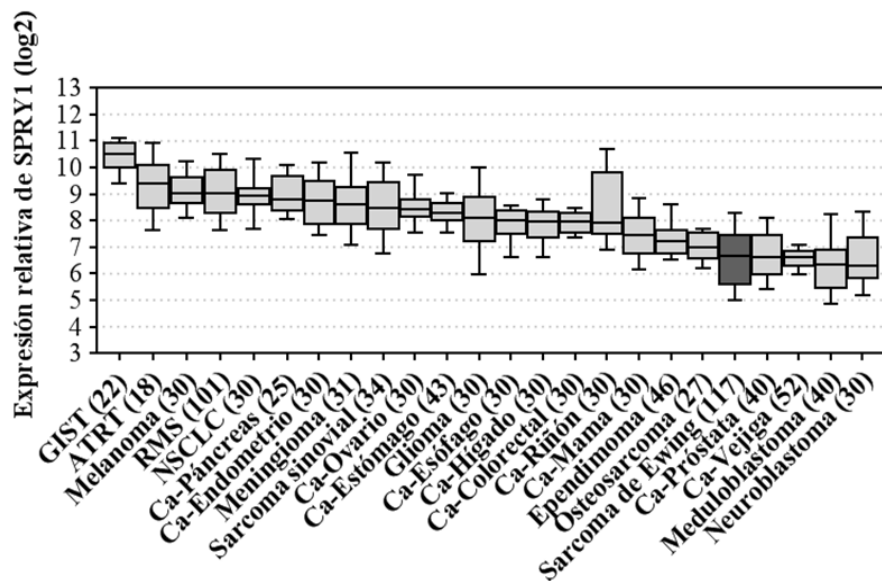


Figura 34. Niveles de expresión de ARNm de SPRY1 en 24 tipos de tumores sólidos, determinados mediante *microarrays* de ADN de Affymetrix HG-U133plus2.0. Los datos fueron obtenidos del *Gene Expression Omnibus* (GEO) o el *European bioinformatics Institute* (EBI), normalizados simultáneamente por RMA usando un *array* “*brainarray*” (v17, ENTREZG). Las líneas representan las medianas y las barras el rango intercuartil. Las líneas de desviación representan los cuartiles 10 y 90. El número de muestras analizadas aparece entre paréntesis. La barra de sarcoma de Ewing aparece en gris oscuro. GIST: tumor estromal gastrointestinal, ATRT: tumor teratoide/rabdoide atípico, RMS: rhabdomyosarcoma, NSCLC: carcinoma de pulmón no microcítico, Ca-: carcinoma.

A continuación comparamos los niveles de expresión de *SPRY1* en tumores y líneas celulares de sarcoma de Ewing. Para ello, analizamos los datos de expresión de la cohorte de 117 tumores primarios de sarcoma de Ewing con las 15 líneas celulares de sarcoma de Ewing incluidas en la *Cancer Cell Line Encyclopedia*. Todos estos datos se generaron usando *microarrays* de Affymetrix HG-U133Plus2.0 y por tanto son comparables una vez realizada una normalización conjunta de ambos grupos de datos.

En la **Figura 35** se muestran los niveles de expresión normalizados en líneas celulares y tumores de Ewing para los genes *SPRY1*, *LOX* (un gen reprimido por EWS-FLI1 (Agra *et al.* 2013)), *NR0B1* (un gen inducido por EWS-FLI1 (Mendiola *et al.* 2006)) y *CD99* (un gen sobre-expresado en sarcomas de Ewing utilizado como marcador en el diagnóstico inmunohistoquímico diferencial anatomopatológico (Kovar *et al.* 1990, Perlman *et al.* 1994)). Como se puede observar en dicha figura, los niveles de expresión de *LOX*, *NR0B1* y *CD99* fueron comparables entre las líneas celulares y los tumores, no apreciándose diferencias significativas. Sin embargo, los niveles de expresión de *SPRY1* fueron significativamente más altos en tumores que en las líneas celulares.

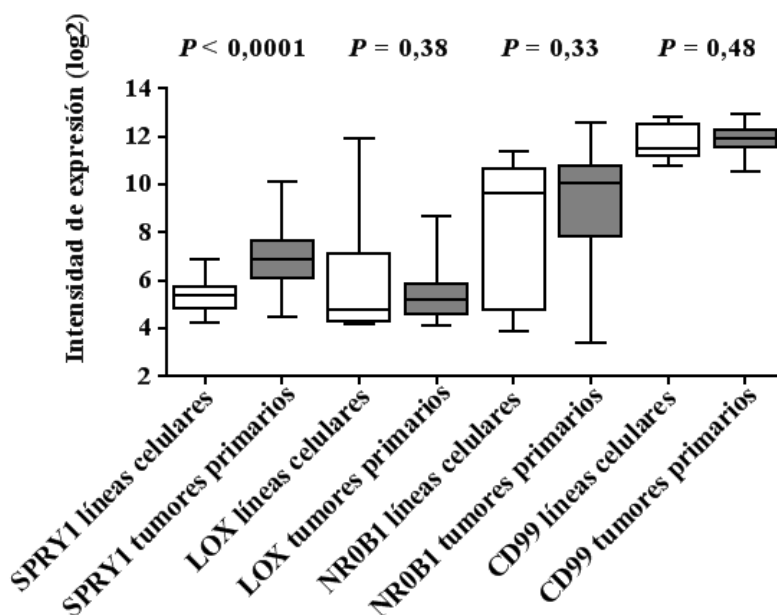


Figura 35. La expresión de *SPRY1* es inferior en líneas celulares que en tumores primarios de sarcoma de Ewing. Expresión relativa de *SPRY1* comparada a otras genes diana de EWS-FLI1 (*LOX*, *NR0B1*) y *CD99* en 15 líneas celulares de sarcoma de Ewing vs 117 tumores primarios de sarcoma de Ewing (todos analizados con el *microarray* Affymetrix HG-U133Plus2.0). Los datos fueron obtenidos de GEO (códigos de acceso: GSE8596, GSE36133, GSE70826, y GSE34620) y normalizados simultáneamente por RMA usando un *array* “*brainarray*” (v17, ENTREZG).

Niveles de expresión moderados de SPRY1 se asocian a un mejor pronóstico en sarcoma de Ewing.

Una vez establecido que en las muestras de tumores primarios existe una cierta variabilidad en la expresión de SPRY1, decidimos estudiar si existía una correlación entre el nivel de expresión de SPRY1 y el pronóstico de la enfermedad en los pacientes con sarcoma de Ewing.

Para ello analizamos una cohorte de 162 pacientes de sarcoma de Ewing formada por 117 casos ya publicados por Postel-Vilnay *et al.* (Postel-Vinay *et al.* 2012) y 45 casos adicionales estudiados en nuestro laboratorio mediante *arrays* de expresión. De todos los casos se dispuso de los niveles de SPRY1 y de los datos clínicos asociados como la supervivencia global, la supervivencia libre de eventos y la presencia de metástasis al diagnóstico.

En primer lugar se estableció un corte basado en el valor mediano de expresión para dividir los pacientes según el nivel de expresión de SPRY1 en “SPRY1-bajo” y “SPRY1-moderado”. Como se muestra en la **Figura 36**, una expresión moderada de SPRY1 se asoció significativamente a una mayor supervivencia global (supervivencia global a 5 años de 0,70 contra 0,38, $P = 0,002$; test log-rank) y supervivencia libre de eventos (supervivencia libre de eventos a los 5 años de 0,72 contra 0,45, $P = 0,0015$; test log-rank).

Además, como se observa en la **Figura 37**, los niveles bajos de SPRY1 se asociaron a un mayor riesgo de presencia de metástasis al diagnóstico ($P = 0,002$, test exacto de Fisher). No se observaron diferencias entre los niveles de expresión de SPRY1 y otras variables como la edad al diagnóstico o el sexo del paciente (**Figura 38**).

En conjunto, estos resultados apuntan a la existencia de una relación entre los niveles de SPRY1 y el grado de agresividad del sarcoma de Ewing, de manera que los niveles de SPRY1 más elevados estarían asociados a un mejor pronóstico de la enfermedad.

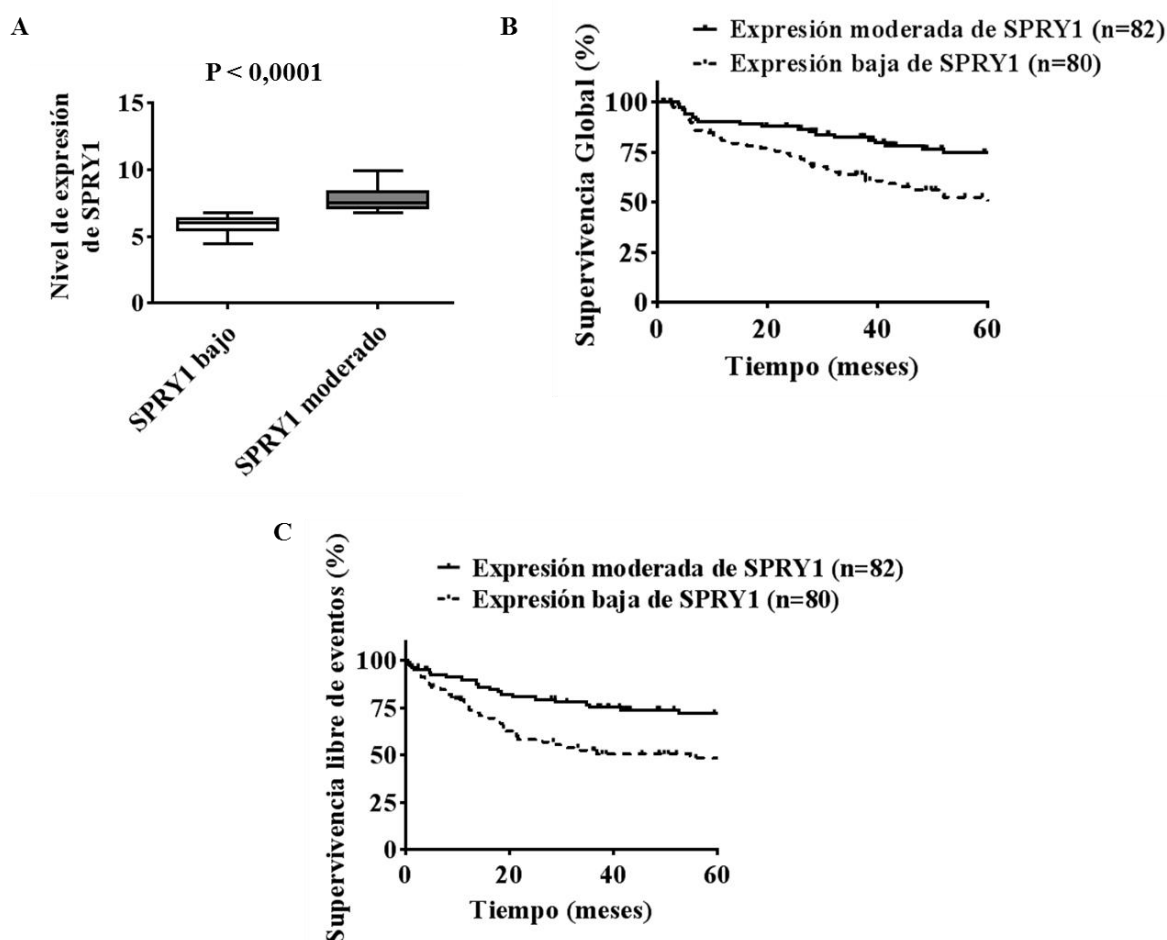


Figura 36. La expresión de SPRY1 correlaciona positivamente con un aumento de la supervivencia global de los pacientes de sarcoma de Ewing. **A.** La cohorte de pacientes se dividió en función de su nivel de expresión de SPRY1 en “SPRY1 bajo” y “SPRY1 moderado” utilizando como punto de corte la mediana. Ambos grupos presentan una expresión de SPRY1 significativamente diferente ($P < 0,001$). **B.** Curvas de estimación de supervivencia de Kaplan-Meier (supervivencia global) en una cohorte de pacientes de sarcoma de Ewing. Los pacientes se clasificaron según su nivel de expresión de SPRY1 en “expresión moderada” o “expresión baja” ($P = 0,002$, test log-rank). **C.** La gráfica muestra la probabilidad de supervivencia libre de eventos vs el nivel de expresión de SPRY1. La expresión moderada de SPRY1 correlaciona positivamente con una mejor supervivencia libre de eventos ($P = 0,0015$, test log rank).

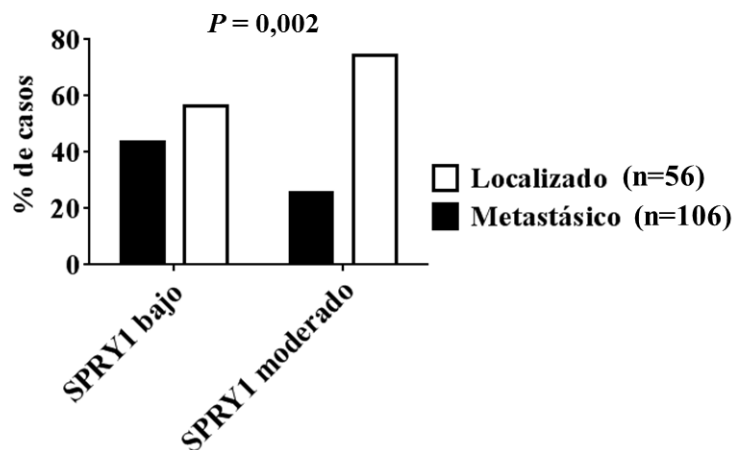


Figura 37. Los niveles de expresión moderados de SPRY1 correlacionan positivamente con un menor porcentaje de casos de metástasis al diagnóstico en los pacientes de sarcoma de Ewing. La gráfica representa el porcentaje de casos de sarcoma de Ewing con metástasis al diagnóstico vs el nivel de expresión de SPRY1 (bajo o moderado). La expresión moderada de SPRY1 correlaciona con un riesgo menor de metástasis al diagnóstico ($P = 0,002$, test exacto de Fisher).

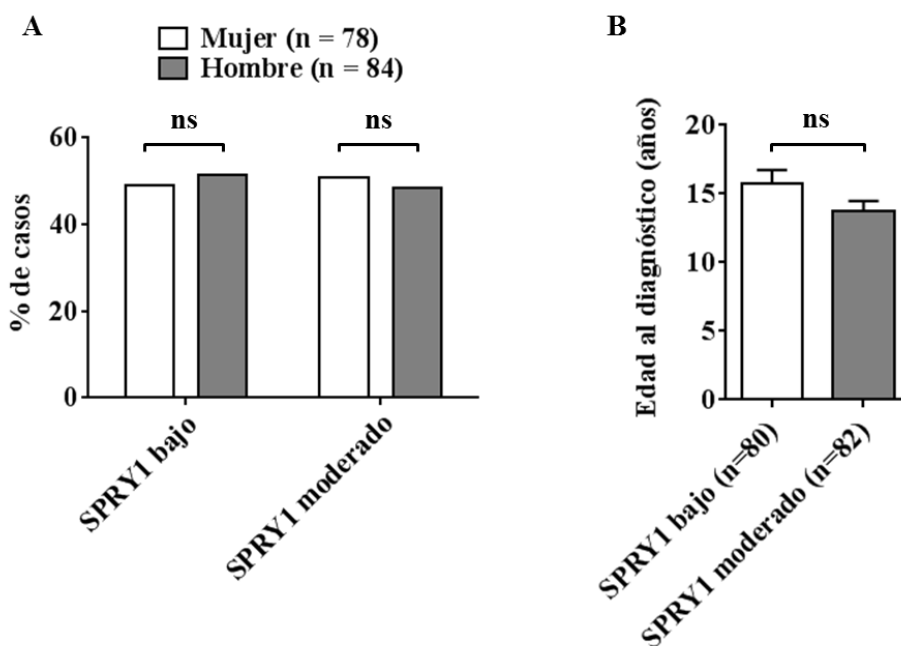


Figura 38. La expresión de SPRY1 no correlaciona con parámetros como el sexo o la edad al diagnóstico de los pacientes analizados. **A.** La gráfica representa el porcentaje de casos en función del sexo del paciente vs el nivel de expresión de SPRY1 y se observa como no hay diferencias significativas (ns: no significativo; Test exacto de Fisher). **B.** La gráfica muestra la edad al diagnóstico (media desviación \pm estándar) vs los niveles de expresión de SPRY1 (baja o moderada). Se observa como no hay una correlación significativa entre ambos parámetros (ns: no significativo; T de Student).

5. Discusión

Los sarcomas de Ewing son tumores pediátricos muy agresivos que se caracterizan, desde un punto de vista molecular, por la presencia de translocaciones cromosómicas que dan lugar a factores de transcripción quiméricos con propiedades oncogénicas. Estos factores de transcripción quiméricos, el más frecuente de los cuales es EWS-FLI1, inducen e inhiben la expresión de múltiples genes implicados en el desarrollo de estos tumores, de ahí que EWS-FLI1 juegue un papel central en la patogénesis del sarcoma de Ewing. Por ello, la identificación y la caracterización funcional de los genes diana de EWS-FLI1 son fundamentales para determinar las rutas implicadas en la patogénesis y la progresión del sarcoma de Ewing. Este conocimiento puede ser clave para establecer nuevas terapias más específicas para su tratamiento (Kovar 2014, Cidre-Aranaz and Alonso 2015).

Como se ha descrito en el apartado de la introducción, a lo largo de los últimos años se han identificado numerosas dianas de EWS-FLI1 tanto directas como indirectas, algunas de las cuáles podrían ser potenciales dianas terapéuticas. Algunos de estos genes diana han sido previamente identificados en nuestro laboratorio mediante la utilización de *arrays* de expresión y sistemas celulares de inhibición condicional de la expresión de EWS-FLI1, como por ejemplo *CCK* (Carrillo *et al.* 2007, Carrillo *et al.* 2009), *NR0B1* (Garcia-Aragoncillo *et al.* 2008), *LOX* (Agra *et al.* 2013) o *DKK1* (Navarro *et al.* 2010).

En esta Tesis hemos identificado un nuevo gen diana de EWS-FLI1, *SPRY1*, y estudiado el papel de este gen en la patogénesis del sarcoma de Ewing, con especial atención en el potencial efecto antitumoral de *SPRY1* en sarcoma de Ewing. Además, se ha mostrado el rol de *SPRY1* como regulador de la vía de señalización de MAPK, así como en el efecto de la inhibición de FGFR sobre la proliferación celular *in vitro* e *in vivo* en células de sarcoma de Ewing. Además se ha analizado el efecto de la utilización de diferentes inhibidores farmacológicos de FGFR sobre la proliferación de las células de sarcoma de Ewing y el posible sinergismo de estos compuestos con el efecto de *SPRY1*. Finalmente se ha estudiado la utilidad de emplear *SPRY1* como biomarcador para determinar el pronóstico en pacientes de sarcoma de Ewing.

EWS-FLI1 regula la expresión de SPRY1 en células de sarcoma de Ewing

En esta Tesis se ha descrito que *SPRY1*, un miembro de la familia de proteínas *Sprouty*, es un gen regulado negativamente por EWS-FLI1 en la línea celular A673 derivada de sarcoma de Ewing. Este efecto resultó ser mayoritario en el caso de *SPRY1*, ya que la expresión del resto de miembros de la familia de proteínas *Sprouty* (*SPRY2-4*) fue solo parcialmente alterada, en comparación, tras la inhibición de EWS-FLI1 en nuestro sistema modelo. En concordancia con esta observación, los niveles de *SPRY1* fueron indetectables o muy bajos en todas las células de sarcoma de Ewing. Estos resultados indican que EWS-FLI1 regula negativamente la expresión de *SPRY1* en sarcoma de Ewing.

Actualmente se desconoce el mecanismo exacto por el que EWS-FLI1 regula negativamente la expresión de *SPRY1*, aunque los resultados disponibles indican que esta regulación es probablemente indirecta. Por ejemplo, dos estudios independientes que emplearon ChIP-seq (Bilke *et al.* 2013, Riggi *et al.* 2014) para determinar los sitios de unión de EWS-FLI1 en el genoma de la célula tumoral A673 sugieren que EWS-FLI1 no se une directamente al promotor de *SPRY1*. Aun así es interesante destacar que en estos estudios, la inhibición de EWS-FLI1 provocó un aumento en las marcas de histonas H3K27ac localizadas en el promotor putativo de *SPRY1* que comprende el exón 1 y el intrón 1 del gen. Esto podría indicar que la regulación de *SPRY1* podría estar mediada por mecanismos epigenéticos que incluyesen modificaciones de histonas, en vez de deberse a una unión directa de EWS-FLI1 al promotor de *SPRY1*.

Otro de los posibles mecanismos epigenéticos que podrían estar implicados en la regulación negativa de *SPRY1* en sarcoma de Ewing es la metilación de su promotor, donde existe una isla CpG que ha sido descrita previamente (Fritzsche *et al.* 2006, Macia *et al.* 2012). De hecho, la hipermetilación del promotor de *SPRY1* es el mecanismo principal por el que se regula negativamente su expresión en carcinoma medular de tiroides y cáncer de próstata (Kwabi-Addo *et al.* 2009, Macia *et al.* 2012).

Sin embargo, en el caso del sarcoma de Ewing, los datos publicados indican que no hay diferencias significativas en el porcentaje de metilación de dichas islas CpG tras inhibir la expresión de EWS-FLI1 (Tomazou *et al.* 2015). Esto sugiere que el mecanismo de

regulación de *SPRY1* en sarcoma de Ewing podría ser diferente del que ocurre en otros tipos de tumores descritos anteriormente (Kwabi-Addo *et al.* 2009, Macia *et al.* 2012).

Aunque en esta Tesis no se ha realizado un estudio en profundidad de los mecanismos epigenéticos potencialmente implicados en la regulación de la expresión de *SPRY1*, los experimentos *in vitro* llevados a cabo con un inhibidor de la desacetilasa de histonas (SAHA) y de la metilación del ADN (5-aza-2'-deoxicitidina) indican que la inhibición de la desacetilación de histonas genera un aumento en la expresión de *SPRY1* mientras que la inhibición de la metilación no genera efectos significativos sobre los niveles de expresión de este gen. Esto concuerda con los resultados presentados por Tomazou y colaboradores, donde al tratar células de sarcoma de Ewing con inhibidores de la desacetilación de histonas como entinostat o romidepsina obtuvieron una inducción de la expresión de los transcritos que correlacionaban inversamente con la expresión de EWS-FLI1, lo que sugiere que el efecto inhibitorio de EWS-FLI1 puede ser revertido mediante el tratamiento con inhibidores de la desacetilación de histonas (Tomazou *et al.* 2015).

Todo esto refuerza la hipótesis de que la regulación de EWS-FLI1 sobre la expresión de *SPRY1* podría estar mediada por mecanismos epigenéticos que involucrasen la acetilación de histonas en su promotor.

Por otro lado, recientemente se ha descrito que EWS-FLI1 reprime de forma directa el 5% de los genes inhibidos por EWS-FLI1 y que el 95% de los genes restantes son regulados de forma indirecta mediante la inducción de represores transcripcionales (Sankar *et al.* 2013). De hecho, coincidiendo con el inicio de esta Tesis, se había publicado la caracterización de *BCL11B*, un gen inducido por EWS-FLI1, como un regulador negativo de la expresión de *SPRY1* mediante análisis de genoma completo (Wiles *et al.* 2013). De este estudio se deduce que *BCL11B* posee una cierta actividad represora sobre *SPRY1* de forma independiente de la represión generada por EWS-FLI1. Sin embargo, la represión completa de *SPRY1* requiere de una regulación más compleja que incluye posiblemente otros genes regulados por EWS-FLI1 (Wiles *et al.* 2013) y, como hemos comentado, posiblemente la participación de mecanismos de regulación epigenética.

En cualquier caso, determinar el mecanismo exacto por el que se regula la expresión de *SPRY1* en sarcoma de Ewing sería de gran interés dado que nos permitiría conocer con más profundidad las diferentes estrategias mediante las que estas células sufren la transformación neoplásica.

SPRY1 es un supresor tumoral en sarcoma de Ewing

El hecho que la expresión de *SPRY1* esté regulada negativamente por EWS-FLI1 en las células A673, que su expresión sea indetectable o muy baja en células y tumores primarios de sarcoma de Ewing y que *SPRY1* sea un potente regulador negativo de la ruta de señalización Ras/MAPK/ERK (Gross *et al.* 2001), sugerían que *SPRY1* podría actuar como un gen supresor de tumores en sarcoma de Ewing. Para demostrarlo, realizamos numerosos ensayos funcionales empleando tres líneas celulares independientes de sarcoma de Ewing que fueron genéticamente manipuladas para re-expresar *SPRY1* de manera condicional en respuesta a doxiciclina.

Gracias a estos modelos celulares se pudo establecer que la re-expresión de *SPRY1* inhibe significativamente la proliferación, el crecimiento clonogénico y la migración de las células de sarcoma de Ewing *in vitro*, indicando que *SPRY1* actúa como un gen supresor de tumores en estas células. Los resultados obtenidos en esta Tesis sugieren que *SPRY1* es un inhibidor de la proliferación en sarcoma de Ewing, especialmente en condiciones de acceso limitado a factores de crecimiento (baja concentración de suero).

Además se comprobó cómo la re-expresión de *SPRY1* inhibe el crecimiento independiente de anclaje (capacidad transformante) en las tres líneas de sarcoma de Ewing estudiadas, lo que concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación y migración y demuestra que *SPRY1* desempeña un rol importante en la transformación maligna de estas células.

Estos resultados coinciden con los estudios llevados a cabo en otros tipos de cáncer en los que se ha descrito que la re-expresión de *SPRY1* inhibe el crecimiento celular, la proliferación, la migración y la capacidad invasiva en una gran variedad de líneas celulares tumorales. Por ejemplo, la re-expresión de *SPRY1* en las líneas celulares de

adenocarcinoma de pulmón A549 y carcinoma de colon HCT 116 inhibe la proliferación al favorecer la degradación lisosomal de uPAR (*urokinase plasminogen activator receptor*) (Liu *et al.* 2014). En células de cáncer de ovario SKOV-3 se ha visto que la expresión de SPRY1 correlaciona negativamente con un aumento del crecimiento, la proliferación, migración e invasión (Masoumi-Moghaddam *et al.* 2014a). Kwabi-Addo y colaboradores demostraron que la transfección de células de cáncer de próstata con SPRY1 generaba un efecto inhibitorio sobre la formación de colonias y la proliferación celular (Kwabi-Addo *et al.* 2004). Por otro lado, Macia y colaboradores han mostrado que la expresión ectópica de SPRY1 redujo la proliferación en células de carcinoma medular de tiroides (Macia *et al.* 2012). Además, en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y de colon HCT 116 se observó una inhibición del crecimiento, de la migración y de la capacidad invasiva de líneas celulares en las que se indujo la expresión de SPRY1 (Mekkawy and Morris 2013, Mekkawy *et al.* 2014). Finalmente, también en neoplasias no epiteliales como el osteosarcoma se ha descrito que SPRY1 inhibe la capacidad invasiva de células SAOS-2 (Mekkawy and Morris 2013).

En cuanto al efecto de SPRY1 sobre la migración celular, que es una de las claves del establecimiento de metástasis (Yilmaz and Christofori 2010), se ha descrito que el *knock-down* de SPRY1 genera un aumento en la actividad de la quinasa Rho (*Ras homolog*), que es una GTPasa implicada en la estabilidad de la actina intracelular (Long *et al.* 2011). Además se ha observado que cuando las proteínas SPRED, que están estructuralmente relacionadas con las proteínas de la familia *Sprouty*, son sobreexpresadas en células de osteosarcoma metastásico LM8, se inhiben la motilidad celular, la migración y la reorganización de actina mediada por Rho (Miyoshi *et al.* 2004). Por otro lado, se ha descrito que la expresión de SPRY4 inhibe la extensión celular mediada por integrinas, necesaria para la reorganización del citoesqueleto en células musculares C2C12 (Tsumura *et al.* 2005).

De forma complementaria, los resultados expuestos en esta Tesis muestran que la reexpresión de SPRY1 en las células de sarcoma de Ewing altera la morfología generando una pérdida de la circularidad que podría ser responsable de la subsiguiente incapacidad para migrar correctamente. Aunque se ha descrito en otros sistemas que la deformación de las células cancerosas correlaciona con un mayor potencial metastásico (Pasqualato *et al.* 2013) en sarcoma de Ewing, al tratarse de células inherentemente redondas y con

poco citoplasma, se podría hipotetizar que es precisamente la pérdida de esta circularidad, ocasionada posiblemente por la presencia de un mayor número de focos de adhesión a la placa, la responsable del efecto que se observa sobre la inhibición de la migración. De hecho, Chaturvedi y colaboradores han descrito recientemente en células de sarcoma de Ewing que la inhibición de EWS-FLI1 genera un aumento en la cantidad de adhesiones focales y del tamaño de las células como consecuencia de un incremento en fibras de estrés de actina, que genera una redistribución del citoesqueleto (Chaturvedi *et al.* 2014). Esta conformación del citoesqueleto es característica de células con una menor capacidad migratoria (Smilenov *et al.* 1999, Salsmann *et al.* 2006) y coincidiría con la morfología que observamos en las células de sarcoma de Ewing cuando se re-expresa SPRY1, lo que explicaría también el efecto de SPRY1 sobre la inhibición de la migración en estas células.

En resumen, en esta Tesis se han analizado múltiples líneas celulares de sarcoma de Ewing y numerosos estudios centrados en las diferentes características de las células transformadas y se ha determinado así el efecto de SPRY1 como inhibidor de la proliferación, el crecimiento clonogénico, la migración, la capacidad invasiva y el crecimiento libre de anclaje de células de sarcoma de Ewing.

SPRY1 inhibe la ruta de las MAPK inducida por suero y FGFb en sarcoma de Ewing

Los resultados presentados en esta Tesis sugieren que la inhibición de SPRY1 favorece la proliferación mediada por FGFb y la activación de las rutas de señalización de Ras/MAPK/ERK en las células de sarcoma de Ewing. Esto se deduce de los experimentos de re-expresión de SPRY1 en las tres líneas de sarcoma de Ewing empleadas en esta Tesis donde se observa que la inducción de SPRY1 inhibe la proliferación celular y la fosforilación de ERK mediada por FGFb. Esto concordaría con los trabajos publicados previamente, que apuntan a SPRY1 como un inhibidor de las rutas reguladas por la activación de RTKs, implicadas en la activación y el mantenimiento de la proliferación celular (Shea *et al.* 2010, Liu *et al.* 2014, Masoumi-Moghaddam *et al.* 2014a, Mekkawy *et al.* 2014).

FGFb regula numerosos procesos celulares como la proliferación, migración y diferenciación en diferentes contextos, tanto fisiológicos como patológicos. Por ejemplo, FGFb está implicado en la migración de las células endoteliales durante la cicatrización en el cierre de heridas regulando la adhesión de moléculas a la superficie celular (Powers *et al.* 2000) y en la proliferación de fibroblastos de ratón (Bottcher and Niehrs 2005). En cuanto a los procesos patológicos, se ha visto que las rutas reguladas por FGFb tienen un rol preponderante en cáncer (Meier *et al.* 2003, Touat *et al.* 2015) y que en el tejido tumoral FGFb puede actuar como un factor autocrino promoviendo, por ejemplo, la angiogénesis en el tejido circundante (Powers *et al.* 2000).

Es importante destacar que, en la actualidad, las rutas de señalización activadas por FGF están emergiendo como puntos clave en la patogénesis del sarcoma de Ewing. Por ejemplo, recientemente hemos descrito que FGFb promueve la proliferación de las células de sarcoma de Ewing *in vitro* y que *EGR2*, un componente *downstream* de la ruta de FGF, es un gen diana inducido por EWS-FLI1 en estas células (Grunewald *et al.* 2015). Otros estudios han demostrado que en el microentorno óseo, FGFb regula la motilidad y la capacidad invasiva de las células de sarcoma de Ewing y que las muestras clínicas de esta neoplasia presentan expresión y activación de FGFR1 (Kamura *et al.* 2010). Por otro lado, Agelopoulos y colaboradores han demostrado recientemente que la inhibición constitutiva de *FGFR1* en células de sarcoma de Ewing impide la formación de tumores en modelos murinos de xenotransplante (Agelopoulos *et al.* 2015). Finalmente, cabe destacar que cerca del 75% de las biopsias de sarcoma de Ewing presentan niveles de fosforilación de FGFR1 moderados o altos (Kamura *et al.* 2010), aunque las mutaciones activadoras de FGFR1 son extremadamente infrecuentes en esta enfermedad (Agelopoulos *et al.* 2015).

Por otro lado se ha propuesto que el tratamiento con FGFb de células de sarcoma de Ewing, mantenidas en ausencia de suero, es capaz de restaurar la expresión de EWS-FLI1 y favorecer su proliferación; y que el tratamiento con anticuerpos neutralizadores de FGFb genera una inhibición de la expresión de EWS-FLI1 (Girnit *et al.* 2000). Más recientemente se ha descrito cómo la estimulación de células de sarcoma de Ewing por FGFb aumenta tanto su motilidad como su capacidad invasiva, efecto que es revertido mediante el uso de anticuerpos anti-FGFb (Kamura *et al.* 2010). Por lo tanto, el mantenimiento de la ruta mediada por FGF sería esencial para la patogénesis del

sarcoma de Ewing. Sin embargo, un estudio de Sturla y colaboradores describe que el tratamiento de células de sarcoma de Ewing con FGFb genera una inducción de la muerte celular y la inhibición del crecimiento de tumores en modelos *in vivo* de xenotransplante murinos (Sturla *et al.* 2000).

Todos estos resultados, sumados a los presentados en esta Tesis, indican que la ruta de señalización activada por FGF puede ser un elemento clave en la patogénesis del sarcoma de Ewing. Además sugieren que las estrategias encaminadas a bloquear esta ruta pueden ser prometedoras en el tratamiento del sarcoma de Ewing.

Los inhibidores de los receptores de FGF muestran actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*

A la luz de los resultados obtenidos en esta Tesis y de la importancia de la ruta de FGFR en sarcoma de Ewing descrita previamente en otros trabajos (Kamura *et al.* 2010, Grunewald *et al.* 2015), podemos especular que la activación constitutiva de los FGFRs y el mantenimiento de sus rutas de señalización *downstream* son claves en la patogénesis del sarcoma de Ewing. Además, la inhibición que EWS-FLI1 ejerce sobre *SPRY1*, que es un regulador negativo de esta ruta de señalización, constituye un mecanismo importante para mantener activas de forma constitutiva estas rutas de señalización. Esta activación sostenida de la ruta FGFR/Ras/MAPK/ERK da lugar a una transducción descontrolada de la señal inducida por FGF que puede contribuir a la progresión tumoral, tal y como ocurre en otros tumores (Meier *et al.* 2003, Touat *et al.* 2015).

Hay varios mecanismos que pueden contribuir a que la señalización por FGFR pueda aparecer activada de forma aberrante en el sarcoma de Ewing: i) como consecuencia de la inhibición de *SPRY1*, un regulador negativo de la ruta, lo que probablemente ocurra en la mayoría de los casos tal y como sugieren los resultados presentados en esta Tesis, ii) debido a la sobreexpresión de FGFRs como ha sido observado en un subgrupo de pacientes (Agelopoulos *et al.* 2015) y iii), debido a mutaciones somáticas de forma muy infrecuente, (Agelopoulos *et al.* 2015). Ya que muchos de los tumores presentarían alteraciones en la ruta del FGF, los pacientes de sarcoma de Ewing podrían beneficiarse

de terapias que incluyesen fármacos dirigidos a inhibir la actividad de los FGFRs o sus dianas *downstream*.

Los resultados de esta Tesis muestran cómo la inhibición de FGFR empleando 4 fármacos diferentes es capaz de inhibir la proliferación y la formación de colonias a baja densidad en varias líneas celulares de sarcoma de Ewing. Además se ha demostrado cómo la inhibición de FGFR mediante uno de estos inhibidores comerciales, es capaz de limitar significativamente el desarrollo de tumores en modelos murinos de xenotransplante de dos líneas celulares de sarcoma de Ewing. Esta inhibición se acompaña de una disminución del número de células en mitosis y un aumento de la proporción de células apoptóticas en los tumores.

La eficacia de los inhibidores de RTK depende de su capacidad para interrumpir la comunicación entre las células tumorales y su entorno (Segaliny *et al.* 2015). En el caso de los inhibidores de FGFR empleados en esta tesis, se trata fundamentalmente de inhibidores de FGFR1 que poseen diferentes IC50s (Mohammadi *et al.* 1998, Panek *et al.* 1998, Sun *et al.* 1999, Guagnano *et al.* 2011). El efecto inhibitorio de las características tumorigénicas de las células de Ewing mostrado en esta Tesis, al emplear estos compuestos, indicaría una presencia mayoritaria de este tipo de receptores de forma activa en las células de sarcoma de Ewing. De hecho, la presencia de receptores FGFR1 activados en muestras tumorales de sarcoma de Ewing ya ha sido descrita previamente por Kamura y colaboradores (Kamura *et al.* 2010).

La búsqueda de nuevos inhibidores de FGFR es un campo muy activo en el ámbito farmacéutico debido a que las vías de señalización mediadas por FGF son uno de los sistemas que se halla más comúnmente mutado en cáncer (Touat *et al.* 2015). Es importante destacar además que algunos de estos inhibidores están siendo analizados en ensayos clínicos como monoterapia para pacientes con otras neoplasias (Shaw *et al.* 2013). Por ejemplo, NVP-BGJ398, desarrollado por Novartis y que ha sido utilizado en esta Tesis, está actualmente empleándose en un ensayo clínico fase I para el tratamiento de cánceres avanzados con amplificación de FGFR1 o -2 o mutaciones en FGFR3 (tumores sólidos avanzados, cáncer de vejiga y carcinoma de célula escamosa). AZD4547, de AstraZéneca, está en estudio en un ensayo clínico fase II para el tratamiento de cánceres con amplificación de FGFR1 o -2 (cáncer gástrico, carcinoma

de célula escamosa, cáncer de esófago y cáncer de mama). Ponatinib de Ariad está en un ensayo clínico fase II para el tratamiento del carcinoma de célula escamosa avanzado y NSCLC. Por último, Dovitinib, de Novartis se ha empleado en un ensayo clínico fase II para el tratamiento de algunos tipos de cáncer con mutaciones en FGFR1, -2 o -3). Actualmente estos ensayos están aún en curso o han arrojado resultados de eficacia moderada para las patologías estudiadas.

Los resultados en sarcoma de Ewing son escasos: Agelopoulos y colaboradores describieron recientemente el caso de un paciente con sarcoma de Ewing en recaída que respondió inicialmente al tratamiento con Ponatinib (ARIAD), un inhibidor de tirosina quinasas de FGFR (Agelopoulos *et al.* 2015). Por ello es necesario continuar profundizando en el estudio de estos inhibidores de FGFR en el tratamiento de pacientes con sarcoma de Ewing.

Los niveles de expresión de SPRY1 pueden ser un nuevo factor pronóstico en sarcoma de Ewing

La importancia de SPRY1 en la regulación de la ruta activada por FGF en sarcoma de Ewing pone de relevancia la posible aplicación de los niveles de actividad de esta ruta como marcador pronóstico. Así, una medida indirecta del potencial de activación de la ruta de señalización de FGF en sarcoma de Ewing podrían ser los propios niveles de SPRY1, de manera que cuanto menor fueran los niveles de SPRY1, más probabilidades habría de tener activada la ruta del FGF. Con el objeto de valorar la utilidad pronóstica de esta hipótesis se realizó un estudio *in situ* con muestras tumorales de sarcoma de Ewing, para intentar determinar si los niveles de expresión de SPRY1 podrían ser además un marcador pronóstico de la enfermedad.

Es interesante destacar que, aunque la expresión de SPRY1 es indetectable en líneas celulares establecidas de sarcoma de Ewing, sus niveles varían en el caso de los tumores primarios. Realmente se desconocen las razones de tales diferencias entre las muestras tumorales primarias y las líneas celulares, pero se podría hipotetizar que los niveles de expresión de SPRY1 se mantienen variables en los tumores, y que son precisamente las condiciones más restrictivas propias del cultivo *in vitro* las que acaban seleccionando y

favoreciendo el crecimiento de aquellas células que presentan niveles más bajos de SPRY1. De acuerdo con esta hipótesis, se ha descrito que las líneas establecidas de sarcoma de Ewing presentan un porcentaje mucho mayor de mutaciones en *STAG2*, *TP53* y *CDKN1A* que las que aparecen en los tumores primarios (Tirode *et al.* 2014), lo que sugiere que las células que derivan de tumores más agresivos son aquellas cuya proliferación es finalmente favorecida en cultivo (Kovar *et al.* 1997, Kovar *et al.* 2003).

El sarcoma de Ewing es un tumor pediátrico muy agresivo en el que el factor de riesgo más importante es la presencia de metástasis primarias en el momento del diagnóstico. De hecho, es este factor el responsable de que normalmente la enfermedad tenga un desenlace fatal a pesar de la implementación de tratamientos quimioterapéuticos muy intensos (Gaspar *et al.* 2015). En esta Tesis se ha mostrado cómo un nivel de expresión bajo de SPRY1 en tumores, correlaciona significativamente con peores valores de supervivencia global y de supervivencia libre de eventos en una cohorte amplia (n = 162) de pacientes con sarcoma de Ewing. Además, es especialmente interesante el hecho de que los tumores primarios que mostraron niveles bajos de SPRY1 pertenecieran mayoritariamente a pacientes que presentaban metástasis en el momento del diagnóstico. Este hecho es compatible con que los tumores con niveles de expresión bajos de SPRY1 tengan un comportamiento más agresivo y concuerda también con los resultados de los experimentos *in vitro* presentados en esta Tesis. Se puede especular entonces que los tumores con expresión baja de SPRY1 podrían presentar una mayor respuesta a la estimulación por factores de crecimiento y, por tanto, tendrían un ritmo de proliferación más alto y una mayor capacidad migratoria, lo que los volvería más agresivos.

Recientemente se ha descrito que los niveles de expresión de SPRY1 podrían ser un biomarcador en cáncer de próstata con capacidad para diferenciar los carcinomas de próstata más agresivos de aquellos con menor grado de malignidad (Terada *et al.* 2014). Además, Fritzsche y colaboradores han descrito, en una cohorte de 49 pacientes con cáncer de próstata, que los niveles de SPRY1 correlacionaban inversamente con los diferentes grados de malignidad (niveles de expresión de SPRY1 cada vez más bajos a medida que se pasaban de muestras de hiperplasia de próstata a neoplasia prostática intraepitelial y a cáncer de próstata) (Fritzsche *et al.* 2006). Por otro lado, en un estudio realizado en una cohorte de 100 pacientes con cáncer de ovario, los niveles de SPRY1

resultaron ser un factor independiente a la hora de predecir la supervivencia global y la probabilidad de recurrencia del tumor (Masoumi-Moghaddam *et al.* 2015). Takahashi y colaboradores estudiaron una cohorte de 29 pacientes con carcinoma renal de células claras con diferentes pronóstico y observaron que el grupo de pacientes con mejor pronóstico presentaba niveles más elevados de SPRY1 (Takahashi *et al.* 2001). En cáncer de mama, Faratian y colaboradores estudiaron una serie de 1107 tumores primarios mediante *arrays* de expresión y observaron que los tumores que presentaban un estadio más avanzado expresaron niveles más bajos de SPRY1 (Faratian *et al.* 2011). Finalmente, los niveles de SPRY1 resultaron ser significativamente inferiores en una serie de pacientes con carcinoma ductal invasivo en comparación con tejidos normales de mama (Faratian *et al.* 2011). En resumen, numerosos estudios demuestran una relación entre los niveles de SPRY1 y el pronóstico de la enfermedad en diferentes tipos de cáncer.

En todos los casos descritos, los tumores pertenecientes a estadios más agresivos presentaron niveles más bajos de SPRY1, y viceversa, los tumores en estadios menos avanzados o los tejidos normales expresaron niveles más elevados de SPRY1. Los resultados presentados en esta Tesis indican un comportamiento similar también en sarcoma de Ewing. Hasta nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se describe una relación entre los niveles de expresión de SPRY1 y el pronóstico de la enfermedad en sarcoma de Ewing. El análisis de este nuevo biomarcador en un estudio prospectivo podría demostrar definitivamente su utilidad a la hora de estratificar los pacientes e incluso seleccionar a los pacientes para el uso de terapias biológicas dirigidas.

SPRY1 y patogénesis en sarcoma de Ewing

Los datos presentados en esta Tesis permiten establecer que la inhibición de SPRY1 mediada por EWS-FLI1 es un mecanismo importante en la patogénesis del sarcoma de Ewing: la inhibición de SPRY1 es necesaria para la proliferación y migración de las células tumorales y el mantenimiento de la ruta de Ras/MAPK/ERK en un estado constitutivamente activo.

Además, los resultados aquí presentados sugieren que la estimulación de la proliferación mediada por FGF podría ser un factor más importante de lo que se había descrito originalmente para esta enfermedad (Kamura *et al.* 2010, Grunewald *et al.* 2015). Los resultados obtenidos con los inhibidores de los receptores de FGF así lo indican y sugieren que la utilización de inhibidores de FGFR en combinación con otros tratamientos podría constituir una nueva terapia prometedora en el tratamiento del sarcoma de Ewing.

Finalmente, se ha mostrado que una expresión más elevada de SPRY1 correlacionaba con una mejor supervivencia global y con una menor incidencia de metástasis al diagnóstico.

La **Figura 39** resume los aspectos más importantes derivados de los estudios llevados a cabo en esta Tesis y nos permite concluir que la inhibición de SPRY1 mediada por EWS-FLI1 confiere una ventaja a las células de sarcoma de Ewing. Además, el conjunto de resultados presentados en esta Tesis sugiere que la ruta FGFR/SPRY1/Ras/MAPK/ERK podría ser una nueva diana terapéutica para el tratamiento de esta devastadora enfermedad. Finalmente, proponemos que los niveles de SPRY1 constituyen un posible nuevo biomarcador de pronóstico para los pacientes de sarcoma de Ewing.

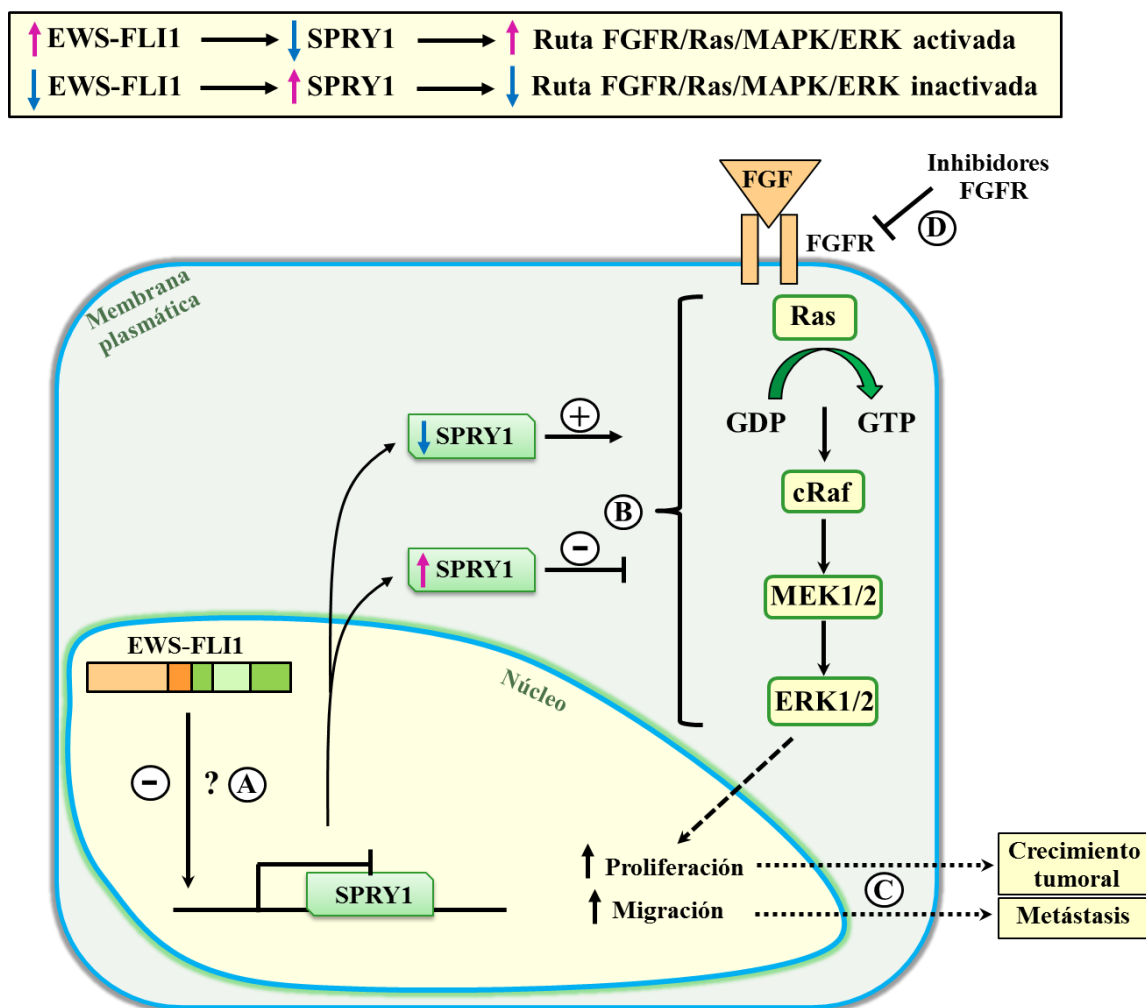


Figura 39. Resumen esquemático de los hallazgos más relevantes en esta Tesis. A. EWS-FLI1 regula negativamente la expresión de SPRY1 mediante un mecanismo todavía desconocido, pero que parece implicar mecanismos epigenéticos. B. La re-expresión de SPRY1 inhibe la señalización de la ruta FGFR/Ras/MAPK/ERK. C. Esto interfiere en la capacidad proliferativa y migratoria de las células de sarcoma de Ewing, lo que tiene un impacto en el crecimiento tumoral y potencialmente en la formación de metástasis. D. Los inhibidores de FGFR inhiben la proliferación de las células de sarcoma de Ewing y esta inhibición podría ocurrir a través de la misma vía de acción que SPRY1.

6. Conclusiones

Las principales conclusiones que podemos extraer de los resultados obtenidos en esta Tesis son:

- I. La oncoproteína EWS-FLI1, característica del sarcoma de Ewing, inhibe la expresión de la proteína Sprouty1 (SPRY1).** Empleando células de sarcoma de Ewing A673 que expresan un ARN de interferencia inducible contra EWS-FLI1 hemos demostrado que EWS-FLI1 regula negativamente la expresión de SPRY1. Además, los resultados obtenidos mediante el análisis de datos de ChIP-seq y la inhibición de la actividad histona desacetilasas *in vitro*, sugieren que esta regulación podría ser indirecta y, al menos en parte, de tipo epigenético. Por otro lado, hemos mostrado que los niveles de expresión de SPRY1 son bajos en células y tumores primarios de sarcoma de Ewing.
- II. SPRY1 es un gen supresor de tumores en el contexto de las células de sarcoma de Ewing.** Empleando sistemas celulares de re-expresión condicional de SPRY1 desarrollados en tres líneas celulares de sarcoma de Ewing, hemos demostrado que la re-expresión de SPRY1 inhibe la proliferación celular, la migración en monocapa y a través de membrana y el crecimiento independiente de anclaje en células de sarcoma de Ewing. Todo ello indica que *SPRY1* actúa como un gen supresor de tumores en sarcoma de Ewing.
- III. SPRY1 antagoniza la activación de la ruta Ras/MAPK/ERK inducida por suero o FGFb en células de sarcoma de Ewing.** La re-expresión de SPRY1 en células de sarcoma de Ewing disminuye la fosforilación de ERK y este efecto está mediado en parte por la inhibición de la ruta controlada por los receptores de FGF.
- IV. La inhibición de FGFR reproduce el efecto de SPRY1 sobre la proliferación y el crecimiento de las células de sarcoma de Ewing.** La inhibición de SPRY1 sobre la ruta de FGFR y su efecto sobre la proliferación celular en células de sarcoma de Ewing se puede obtener mediante el uso de compuestos inhibidores de FGFR. La combinación de la re-expresión de SPRY1 con el uso de estos inhibidores no genera un efecto aditivo en la mayoría de los casos, lo que

sugiere que SPRY1 y los inhibidores de FGFR podrían actuar sobre la misma ruta.

- V. Los inhibidores de FGFR reducen el crecimiento tumoral en modelos de xenotransplantes murinos de células de sarcoma de Ewing.** La inhibición farmacológica de FGFR en modelos de xenotransplantes de ratón empleando dos líneas celulares de sarcoma de Ewing diferentes reduce significativamente su desarrollo. Los tumores procedentes de los animales tratados presentan un menor número de células mitóticas y un mayor número de células apoptóticas.
- VI. SPRY1 es un nuevo biomarcador con valor pronóstico en sarcoma de Ewing.** Empleando una cohorte amplia de pacientes de sarcoma de Ewing hemos determinado que una expresión más elevada de SPRY1 correlaciona con una mejor supervivencia global y una mayor supervivencia libre de eventos. Asimismo, niveles más bajos de expresión de SPRY1 correlacionan con mayores probabilidades de que el paciente presente metástasis en el momento del diagnóstico.

7. Bibliografía

Agelopoulos, K., G. H. Richter, E. Schmidt, U. Dirksen, K. von Heyking, B. Moser, H. U. Klein, U. Kontny, M. Dugas, K. Poos, E. Korsching, T. Buch, M. Weckesser, I. Schulze, R. Besoke, A. Witten, M. Stoll, G. Kohler, W. Hartmann, E. Wardelmann, C. Rossig, D. Baumhoer, H. Jurgens, S. Burdach, W. E. Berdel and C. Muller-Tidow (2015). "Deep Sequencing in Conjunction with Expression and Functional Analyses Reveals Activation of FGFR1 in Ewing Sarcoma." Clin Cancer Res **21**(21):4935-46.

Agra, N., F. Cidre, L. Garcia-Garcia, J. de la Parra and J. Alonso (2013). "Lysyl oxidase is downregulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and its propeptide domain displays tumor supressor activities in ewing sarcoma cells." PLoS One **8**(6): e66281.

Armengol, G., M. Tarkkanen, M. Virolainen, A. Forus, J. Valle, T. Bohling, S. Asko-Seljavaara, C. Blomqvist, I. Elomaa, E. Karaharju, A. H. Kivioja, M. A. Siimes, E. Tukiainen, M. R. Caballin, O. Myklebost and S. Knuutila (1997). "Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridization." Br J Cancer **75**(10): 1403-1409.

Arvand, A. and C. T. Denny (2001). "Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors." Oncogene **20**(40): 5747-5754.

Arvand, A., S. M. Welford, M. A. Teitell and C. T. Denny (2001). "The COOH-terminal domain of FLI-1 is necessary for full tumorigenesis and transcriptional modulation by EWS/FLI-1." Cancer Res **61**(13): 5311-5317.

Assinder, S. J., D. Beniamen and F. J. Lovicu (2015). "Cosuppression of Sprouty and Sprouty-related negative regulators of FGF signalling in prostate cancer: a working hypothesis." Biomed Res Int **2015**: 827462.

Bailly, R. A., R. Bosselut, J. Zucman, F. Cormier, O. Delattre, M. Roussel, G. Thomas and J. Ghysdael (1994). "DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma." Mol Cell Biol **14**(5): 3230-3241.

Barber-Rotenberg, J. S., S. P. Selvanathan, Y. Kong, H. V. Erkizan, T. M. Snyder, S. P. Hong, C. L. Kobs, N. L. South, S. Summer, P. J. Monroe, M. Chruszcz, V. Dobrev, P. N. Tosso, L. J. Scher, W. Minor, M. L. Brown, S. J. Metallo, A. Uren and J. A. Toretzky (2012). "Single enantiomer of YK-4-279 demonstrates specificity in targeting the oncogene EWS-FLI1." Oncotarget **3**(2): 172-182.

Barretina, J., G. Caponigro, N. Stransky, K. Venkatesan, A. A. Margolin, S. Kim, C. J. Wilson, J. Lehar, G. V. Kryukov, D. Sonkin, A. Reddy, M. Liu, L. Murray, M. F. Berger, J. E. Monahan, P. Morais, J. Meltzer, A. Korejwa, J. Jane-Valbuena, F. A. Mapa, J. Thibault, E. Bric-Furlong, P. Raman, A. Shipway, I. H. Engels, J. Cheng, G. K. Yu, J. Yu, P. Aspesi, Jr., M. de Silva, K. Jagtap, M. D. Jones, L. Wang, C. Hatton, E. Palescandolo, S. Gupta, S. Mahan, C. Sougnez, R. C. Onofrio, T. Liefeld, L. MacConaill, W. Winckler, M. Reich, N. Li, J. P. Mesirov, S. B. Gabriel, G. Getz, K. Ardlie, V. Chan, V. E. Myer, B. L. Weber, J. Porter, M. Warmuth, P. Finan, J. L. Harris, M. Meyerson, T. R. Golub, M. P. Morrissey, W. R. Sellers, R. Schlegel and L. A. Garraway (2012). "The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity." Nature **483**(7391): 603-607.

Baruchel, S., A. Pappo, M. Krailo, K. S. Baker, B. Wu, D. Villaluna, M. Lee-Scott, P. C. Adamson and S. M. Blaney (2012). "A phase 2 trial of trabectedin in children with recurrent rhabdomyosarcoma, Ewing sarcoma and non-rhabdomyosarcoma soft tissue sarcomas: a report from the Children's Oncology Group." *Eur J Cancer* **48**(4): 579-585.

Basson, M. A., S. Akbulut, J. Watson-Johnson, R. Simon, T. J. Carroll, R. Shakya, I. Gross, G. R. Martin, T. Lufkin, A. P. McMahon, P. D. Wilson, F. D. Costantini, I. J. Mason and J. D. Licht (2005). "Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction." *Dev Cell* **8**(2): 229-239.

Basson, M. A., J. Watson-Johnson, R. Shakya, S. Akbulut, D. Hyink, F. D. Costantini, P. D. Wilson, I. J. Mason and J. D. Licht (2006). "Branching morphogenesis of the ureteric epithelium during kidney development is coordinated by the opposing functions of GDNF and Sprouty1." *Dev Biol* **299**(2): 466-477.

Bastida, E., J. del Prado, L. Almirall, G. A. Jamieson and A. Ordinas (1985). "Inhibitory effects of dipyridamole on growth, nucleoside incorporation, and platelet-activating capability in the U87MG and SKNMC human tumor cell lines." *Cancer Res* **45**(9): 4048-4052.

Beck, R., M. J. Monument, W. S. Watkins, R. Smith, K. M. Boucher, J. D. Schiffman, L. B. Jorde, R. L. Randall and S. L. Lessnick (2012). "EWS/FLI-responsive GGAA microsatellites exhibit polymorphic differences between European and African populations." *Cancer Genet* **205**(6): 304-312.

Benini, S., M. C. Manara, N. Baldini, V. Cerisano, S. Massimo, M. Mercuri, P. L. Lollini, P. Nanni, P. Picci and K. Scotlandi (2001). "Inhibition of insulin-like growth factor I receptor increases the antitumor activity of doxorubicin and vincristine against Ewing's sarcoma cells." *Clin Cancer Res* **7**(6): 1790-1797.

Biedler, J. L., S. Roffler-Tarlov, M. Schachner and L. S. Freedman (1978). "Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones." *Cancer Res* **38**(11 Pt 1): 3751-3757.

Bigot, A., W. J. Duddy, Z. G. Ouandaogo, E. Negroni, V. Mariot, S. Ghimbovski, B. Harmon, A. Wielgosik, C. Loiseau, J. Devaney, J. Dumonceaux, G. Butler-Browne, V. Mouly and S. Duguez (2015). "Age-Associated Methylation Suppresses SPRY1, Leading to a Failure of Re-quiescence and Loss of the Reserve Stem Cell Pool in Elderly Muscle." *Cell Rep* **13**(6): 1172-1182.

Bilke, S., R. Schwentner, F. Yang, M. Kauer, G. Jug, R. L. Walker, S. Davis, Y. J. Zhu, M. Pineda, P. S. Meltzer and H. Kovar (2013). "Oncogenic ETS fusions deregulate E2F3 target genes in Ewing sarcoma and prostate cancer." *Genome Res* **23**(11): 1797-1809.

Bottcher, R. T. and C. Niehrs (2005). "Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development." *Endocr Rev* **26**(1): 63-77.

Brodeur, G. M., G. Sekhon and M. N. Goldstein (1977). "Chromosomal aberrations in human neuroblastomas." *Cancer* **40**(5): 2256-2263.

Carrillo, J., N. Agra, N. Fernandez, A. Pestana and J. Alonso (2009). "Devazepide, a nonpeptide antagonist of CCK receptors, induces apoptosis and inhibits Ewing tumor growth." Anticancer Drugs **20**(7): 527-533.

Carrillo, J., E. Garcia-Aragoncillo, D. Azorin, N. Agra, A. Sastre, I. Gonzalez-Mediero, P. Garcia-Miguel, A. Pestana, S. Gallego, D. Segura and J. Alonso (2007). "Cholecystokinin down-regulation by RNA interference impairs Ewing tumor growth." Clin Cancer Res **13**(8): 2429-2440.

Casci, T., J. Vinos and M. Freeman (1999). "Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling." Cell **96**(5): 655-665.

Cavazzana, A. O., J. S. Miser, J. Jefferson and T. J. Triche (1987). "Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone." Am J Pathol **127**(3): 507-518.

Cidre-Aranaz, F. and J. Alonso (2015). "EWS/FLI1 Target Genes and Therapeutic Opportunities in Ewing Sarcoma." Front Oncol **5**: 162.

Cidre-Aranaz, F., T. G. Grunewald, D. Surdez, L. Garcia-Garcia, J. Carlos Lazaro, T. Kirchner, L. Gonzalez-Gonzalez, A. Sastre, P. Garcia-Miguel, S. E. Lopez-Perez, S. Monzon, O. Delattre and J. Alonso (2016). "EWS-FLI1-mediated suppression of the RAS-antagonist Sprouty 1 (SPRY1) confers aggressiveness to Ewing sarcoma." Oncogene.

Collins, S., A. Waickman, A. Basson, A. Kupfer, J. D. Licht, M. R. Horton and J. D. Powell (2012). "Regulation of CD4(+) and CD8(+) effector responses by Sprouty-1." PLoS One **7**(11): e49801.

Chambers, D. and I. Mason (2000). "Expression of sprouty2 during early development of the chick embryo is coincident with known sites of FGF signalling." Mech Dev **91**(1-2): 361-364.

Chaturvedi, A., L. M. Hoffman, C. C. Jensen, Y. C. Lin, A. H. Grossmann, R. L. Randall, S. L. Lessnick, A. L. Welm and M. C. Beckerle (2014). "Molecular dissection of the mechanism by which EWS/FLI expression compromises actin cytoskeletal integrity and cell adhesion in Ewing sarcoma." Mol Biol Cell **25**(18): 2695-2709.

Ching, S. T., G. R. Cunha, L. S. Baskin, M. A. Basson and O. D. Klein (2014). "Coordinated activity of Spry1 and Spry2 is required for normal development of the external genitalia." Dev Biol **386**(1): 1-11.

Choi, H., S. Y. Cho, R. H. Schwartz and K. Choi (2006). "Dual effects of Sprouty1 on TCR signaling depending on the differentiation state of the T cell." J Immunol **176**(10): 6034-6045.

Christofori, G. (2003). "Split personalities: the agonistic antagonist Sprouty." Nat Cell Biol **5**(5): 377-379.

Dauphinot, L., C. De Oliveira, T. Melot, N. Sevenet, V. Thomas, B. E. Weissman and O. Delattre (2001). "Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell

- lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression." Oncogene **20**(25): 3258-3265.
- de Maximy, A. A., Y. Nakatake, S. Moncada, N. Itoh, J. P. Thiery and S. Bellusci (1999). "Cloning and expression pattern of a mouse homologue of drosophila sprouty in the mouse embryo." Mech Dev **81**(1-2): 213-216.
- Delattre, O., J. Zucman, B. Plougastel, C. Desmaze, T. Melot, M. Peter, H. Kovar, I. Joubert, P. de Jong, G. Rouleau and *et al.* (1992). "Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours." Nature **359**(6391): 162-165.
- Donaldson, L. W., J. M. Petersen, B. J. Graves and L. P. McIntosh (1994). "Secondary structure of the ETS domain places murine Ets-1 in the superfamily of winged helix-turn-helix DNA-binding proteins." Biochemistry **33**(46): 13509-13516.
- Edwards, R. H., J. Chatten, Q. B. Xiong and F. G. Barr (1997). "Detection of gene fusions in rhabdomyosarcoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay of archival samples." Diagn Mol Pathol **6**(2): 91-97.
- Erkizan, H. V., V. N. Uversky and J. A. Toretsky (2010). "Oncogenic partnerships: EWS-FLI1 protein interactions initiate key pathways of Ewing's sarcoma." Clin Cancer Res **16**(16): 4077-4083.
- Esiashvili, N., M. Goodman and R. B. Marcus, Jr. (2008). "Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data." J Pediatr Hematol Oncol **30**(6): 425-430.
- Faedo, A., U. Borello and J. L. Rubenstein (2010). "Repression of Fgf signaling by sprouty1-2 regulates cortical patterning in two distinct regions and times." J Neurosci **30**(11): 4015-4023.
- Faratian, D., A. H. Sims, P. Mullen, C. Kay, I. Um, S. P. Langdon and D. J. Harrison (2011). "Sprouty 2 is an independent prognostic factor in breast cancer and may be useful in stratifying patients for trastuzumab therapy." PLoS One **6**(8): e23772.
- Fogh, J., W. C. Wright and J. D. Loveless (1977). "Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors." J Natl Cancer Inst **58**(2): 209-214.
- Folpe, A. L., C. E. Hill, D. M. Parham, P. A. O'Shea and S. W. Weiss (2000). "Immunohistochemical detection of FLI-1 protein expression: a study of 132 round cell tumors with emphasis on CD99-positive mimics of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor." Am J Surg Pathol **24**(12): 1657-1662.
- Fritzsche, S., M. Kenzelmann, M. J. Hoffmann, M. Muller, R. Engers, H. J. Grone and W. A. Schulz (2006). "Concomitant down-regulation of SPRY1 and SPRY2 in prostate carcinoma." Endocr Relat Cancer **13**(3): 839-849.

Frolik, C. A., P. P. Roller, J. L. Cone, L. L. Dart, D. M. Smith and M. B. Sporn (1984). "Inhibition of transforming growth factor-induced cell growth in soft agar by oxidized polyamines." Arch Biochem Biophys **230**(1): 93-102.

Gangwal, K., D. Close, C. A. Enriquez, C. P. Hill and S. L. Lessnick (2010). "Emergent Properties of EWS/FLI Regulation via GGAA Microsatellites in Ewing's Sarcoma." Genes Cancer **1**(2): 177-187.

Gangwal, K., S. Sankar, P. C. Hollenhorst, M. Kinsey, S. C. Haroldsen, A. A. Shah, K. M. Boucher, W. S. Watkins, L. B. Jorde, B. J. Graves and S. L. Lessnick (2008). "Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(29): 10149-10154.

Garcia-Aragoncillo, E., J. Carrillo, E. Lalli, N. Agra, G. Gomez-Lopez, A. Pestana and J. Alonso (2008). "DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell-cycle progression in Ewing's tumor cells." Oncogene **27**(46): 6034-6043.

Gartel, A. L. (2011). "Thiostrepton, proteasome inhibitors and FOXM1." Cell Cycle **10**(24): 4341-4342.

Gaspar, N., D. S. Hawkins, U. Dirksen, I. J. Lewis, S. Ferrari, M. C. Le Deley, H. Kovar, R. Grimer, J. Whelan, L. Claude, O. Delattre, M. Paulussen, P. Picci, K. Sundby Hall, H. van den Berg, R. Ladenstein, J. Michon, L. Hjorth, I. Judson, R. Luksch, M. L. Bernstein, P. Marec-Berard, B. Brennan, A. W. Craft, R. B. Womer, H. Juergens and O. Oberlin (2015). "Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration." J Clin Oncol **33**(27): 3036-3046.

Ginsberg, J. P., E. de Alava, M. Ladanyi, L. H. Wexler, H. Kovar, M. Paulussen, A. Zoubek, B. Dockhorn-Dworniczak, H. Juergens, J. S. Wunder, I. L. Andrulis, R. Malik, P. H. Sorensen, R. B. Womer and F. G. Barr (1999). "EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma." J Clin Oncol **17**(6): 1809-1814.

Giovanini, M. A., T. A. Eskin, S. K. Mukherji and J. P. Mickle (1994). "Granulomatous angiitis of the spinal cord: a case report." Neurosurgery **34**(3): 540-543.

Girnit, L., A. Girnit, M. Wang, J. M. Meis-Kindblom, L. G. Kindblom and O. Larsson (2000). "A link between basic fibroblast growth factor (bFGF) and EWS/FLI-1 in Ewing's sarcoma cells." Oncogene **19**(37): 4298-4301.

Grier, H. E. (1997). "The Ewing family of tumors. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors." Pediatr Clin North Am **44**(4): 991-1004.

Grohar, P. J., L. B. Griffin, C. Yeung, Q. R. Chen, Y. Pommier, C. Khanna, J. Khan and L. J. Helman (2011). "Ecteinascidin 743 interferes with the activity of EWS-FLI1 in Ewing sarcoma cells." Neoplasia **13**(2): 145-153.

Grohar, P. J. and L. J. Helman (2013). "Prospects and challenges for the development of new therapies for Ewing sarcoma." Pharmacol Ther **137**(2): 216-224.

- Grohar, P. J., S. Kim, G. O. Rangel Rivera, N. Sen, S. Haddock, M. L. Harlow, N. K. Maloney, J. Zhu, M. O'Neill, T. L. Jones, K. Huppi, M. Grandin, K. Gehlhaus, C. A. Klumpp-Thomas, E. Buehler, L. J. Helman, S. E. Martin and N. J. Caplen (2016). "Functional Genomic Screening Reveals Splicing of the EWS-FLI1 Fusion Transcript as a Vulnerability in Ewing Sarcoma." *Cell Rep* **14**(3): 598-610.
- Gross, I., B. Bassit, M. Benezra and J. D. Licht (2001). "Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation." *J Biol Chem* **276**(49): 46460-46468.
- Gross, I., D. J. Morrison, D. P. Hyink, K. Georgas, M. A. English, M. Mericskay, S. Hosono, D. Sassoon, P. D. Wilson, M. Little and J. D. Licht (2003). "The receptor tyrosine kinase regulator Sprouty1 is a target of the tumor suppressor WT1 and important for kidney development." *J Biol Chem* **278**(42): 41420-41430.
- Grunewald, T. G., V. Bernard, P. Gilardi-Hebenstreit, V. Raynal, D. Surdez, M. M. Aynaud, O. Mirabeau, F. Cidre-Aranaz, F. Tirode, S. Zaidi, G. Perot, A. H. Jonker, C. Lucchesi, M. C. Le Deley, O. Oberlin, P. Marec-Berard, A. S. Veron, S. Reynaud, E. Lapouble, V. Boeva, T. Rio Frio, J. Alonso, S. Bhatia, G. Pierron, G. Cancel-Tassin, O. Cussenot, D. G. Cox, L. M. Morton, M. J. Machiela, S. J. Chanock, P. Charnay and O. Delattre (2015). "Chimeric EWSR1-FLI1 regulates the Ewing sarcoma susceptibility gene EGR2 via a GGAA microsatellite." *Nat Genet* **47**(9): 1073-1078.
- Grunewald, T. G., I. Diebold, I. Esposito, S. Plehm, K. Hauer, U. Thiel, P. da Silva-Buttkus, F. Neff, R. Unland, C. Muller-Tidow, C. Zobywalski, K. Lohrig, U. Lewandrowski, A. Sickmann, O. Prazeres da Costa, A. Gorlach, A. Cossarizza, E. Butt, G. H. Richter and S. Burdach (2012). "STEAP1 is associated with the invasive and oxidative stress phenotype of Ewing tumors." *Mol Cancer Res* **10**(1): 52-65.
- Guagnano, V., P. Furet, C. Spanka, V. Bordas, M. Le Douget, C. Stamm, J. Brueggen, M. R. Jensen, C. Schnell, H. Schmid, M. Wartmann, J. Berghausen, P. Drueckes, A. Zimmerlin, D. Bussiere, J. Murray and D. Graus Porta (2011). "Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase." *J Med Chem* **54**(20): 7066-7083.
- Guillon, N., F. Tirode, V. Boeva, A. Zynovyev, E. Barillot and O. Delattre (2009). "The oncogenic EWS-FLI1 protein binds in vivo GGAA microsatellite sequences with potential transcriptional activation function." *PLoS One* **4**(3): e4932.
- Guy, G. R., R. A. Jackson, P. Yusoff and S. Y. Chow (2009). "Sprouty proteins: modified modulators, matchmakers or missing links?" *J Endocrinol* **203**(2): 191-202.
- Hacohen, N., S. Kramer, D. Sutherland, Y. Hiromi and M. A. Krasnow (1998). "sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways." *Cell* **92**(2): 253-263.

Hahm, K. B., K. Cho, C. Lee, Y. H. Im, J. Chang, S. G. Choi, P. H. Sorensen, C. J. Thiele and S. J. Kim (1999). "Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein." Nat Genet **23**(2): 222-227.

Hamilton, S. N., R. Carlson, H. Hasan, S. R. Rassekh and K. Goddard (2015). "Long-term Outcomes and Complications in Pediatric Ewing Sarcoma." Am J Clin Oncol.

Hanafusa, H., S. Torii, T. Yasunaga and E. Nishida (2002). "Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway." Nat Cell Biol **4**(11): 850-858.

Hattinger, C. M., S. Rumpler, S. Strehl, I. M. Ambros, A. Zoubek, U. Potschger, H. Gadner and P. F. Ambros (1999). "Prognostic impact of deletions at 1p36 and numerical aberrations in Ewing tumors." Genes Chromosomes Cancer **24**(3): 243-254.

Herrero-Martin, D., D. Osuna, J. L. Ordonez, V. Sevillano, A. S. Martins, C. Mackintosh, M. Campos, J. Madoz-Gurpide, A. P. Otero-Motta, G. Caballero, A. T. Amaral, D. H. Wai, Y. Braun, M. Eisenacher, K. L. Schaefer, C. Poremba and E. de Alava (2009). "Stable interference of EWS-FLI1 in an Ewing sarcoma cell line impairs IGF-1/IGF-1R signalling and reveals TOPK as a new target." Br J Cancer **101**(1): 80-90.

Hibshoosh, H. and R. Lattes (1997). "Immunohistochemical and molecular genetic approaches to soft tissue tumor diagnosis: a primer." Semin Oncol **24**(5): 515-525.

Hu-Lieskovan, S., J. D. Heidel, D. W. Bartlett, M. E. Davis and T. J. Triche (2005). "Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma." Cancer Res **65**(19): 8984-8992.

Hubbard, S. R. and W. T. Miller (2007). "Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling." Curr Opin Cell Biol **19**(2): 117-123.

Jackson, T. M., M. Bittman and L. Granowetter (2016). "Pediatric Malignant Bone Tumors: A Review and Update on Current Challenges, and Emerging Drug Targets." Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.

Jaishankar, S., J. Zhang, M. F. Roussel and S. J. Baker (1999). "Transforming activity of EWS/FLI is not strictly dependent upon DNA-binding activity." Oncogene **18**(40): 5592-5597.

Jeon, I. S., J. N. Davis, B. S. Braun, J. E. Sublett, M. F. Roussel, C. T. Denny and D. N. Shapiro (1995). "A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1." Oncogene **10**(6): 1229-1234.

Kamura, S., Y. Matsumoto, J. I. Fukushi, T. Fujiwara, K. Iida, Y. Okada and Y. Iwamoto (2010). "Basic fibroblast growth factor in the bone microenvironment enhances cell motility and invasion of Ewing's sarcoma family of tumours by activating the FGFR1-PI3K-Rac1 pathway." Br J Cancer **103**(3): 370-381.

- Kaneko, Y., H. Kobayashi, M. Handa, N. Satake and N. Maseki (1997). "EWS-ERG fusion transcript produced by chromosomal insertion in a Ewing sarcoma." Genes Chromosomes Cancer **18**(3): 228-231.
- Karnieli, E., H. Werner, F. J. Rauscher, 3rd, L. E. Benjamin and D. LeRoith (1996). "The IGF-I receptor gene promoter is a molecular target for the Ewing's sarcoma-Wilms' tumor 1 fusion protein." J Biol Chem **271**(32): 19304-19309.
- Khoury, J. D. (2005). "Ewing sarcoma family of tumors." Adv Anat Pathol **12**(4): 212-220.
- Kim, G. E., B. Beach, J. M. Gastier-Foster, J. L. Murata-Collins, J. M. Rowland, R. J. O'Donnell and R. E. Goldsby (2005). "Ewing sarcoma as a second malignant neoplasm after acute lymphoblastic leukemia." Pediatr Blood Cancer **45**(1): 57-59.
- Kim, S., C. T. Denny and R. Wisdom (2006). "Cooperative DNA binding with AP-1 proteins is required for transformation by EWS-Ets fusion proteins." Mol Cell Biol **26**(7): 2467-2478.
- Klein, O. D., G. Minowada, R. Peterkova, A. Kangas, B. D. Yu, H. Lesot, M. Peterka, J. Jernvall and G. R. Martin (2006). "Sprouty genes control diastema tooth development via bidirectional antagonism of epithelial-mesenchymal FGF signaling." Dev Cell **11**(2): 181-190.
- Kolb, E. A., R. Gorlick, P. J. Houghton, C. L. Morton, R. Lock, H. Carol, C. P. Reynolds, J. M. Maris, S. T. Keir, C. A. Billups and M. A. Smith (2008). "Initial testing (stage 1) of a monoclonal antibody (SCH 717454) against the IGF-1 receptor by the pediatric preclinical testing program." Pediatr Blood Cancer **50**(6): 1190-1197.
- Kovar, H. (2014). "Blocking the road, stopping the engine or killing the driver? Advances in targeting EWS/FLI-1 fusion in Ewing sarcoma as novel therapy." Expert Opin Ther Targets **18**(11): 1315-1328.
- Kovar, H., J. Amatruda, E. Brunet, S. Burdach, F. Cidre-Aranaz, E. de Alava, U. Dirksen, W. van der Ent, P. Grohar, T. G. Grunewald, L. Helman, P. Houghton, K. Iljin, E. Korsching, M. Ladanyi, E. Lawlor, S. Lessnick, J. Ludwig, P. Meltzer, M. Metzler, J. Mora, R. Moriggl, T. Nakamura, T. Papamarkou, B. Radic Sarikas, F. Redini, G. H. Richter, C. Rossig, K. Schadler, B. W. Schafer, K. Scotlandi, N. C. Sheffield, A. Shelat, E. Snaar-Jagalska, P. Sorensen, K. Stegmaier, E. Stewart, A. Sweet-Cordero, K. Szuhai, O. M. Tirado, F. Tirede, J. Toretsky, K. Tsafou, A. Uren, A. Zinovyev and O. Delattre (2016). "The second European interdisciplinary Ewing sarcoma research summit - A joint effort to deconstructing the multiple layers of a complex disease." Oncotarget **7**(8): 8613-8624.
- Kovar, H., D. N. Aryee, G. Jug, C. Henockl, M. Schemper, O. Delattre, G. Thomas and H. Gadner (1996). "EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro." Cell Growth Differ **7**(4): 429-437.

Kovar, H., M. Dworzak, S. Strehl, E. Schnell, I. M. Ambros, P. F. Ambros and H. Gadner (1990). "Overexpression of the pseudoautosomal gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor." Oncogene **5**(7): 1067-1070.

Kovar, H., G. Jug, D. N. Aryee, A. Zoubek, P. Ambros, B. Gruber, R. Windhager and H. Gadner (1997). "Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors." Oncogene **15**(18): 2225-2232.

Kovar, H., S. Pospisilova, G. Jug, D. Printz and H. Gadner (2003). "Response of Ewing tumor cells to forced and activated p53 expression." Oncogene **22**(21): 3193-3204.

Kuracha, M. R., D. Burgess, E. Siefker, J. T. Cooper, J. D. Licht, M. L. Robinson and V. Govindarajan (2011). "Spry1 and Spry2 are necessary for lens vesicle separation and corneal differentiation." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(9): 6887-6897.

Kuracha, M. R., E. Siefker, J. D. Licht and V. Govindarajan (2013). "Spry1 and Spry2 are necessary for eyelid closure." Dev Biol **383**(2): 227-238.

Kwabi-Addo, B., C. Ren and M. Ittmann (2009). "DNA methylation and aberrant expression of Sprouty1 in human prostate cancer." Epigenetics **4**(1): 54-61.

Kwabi-Addo, B., J. Wang, H. Erdem, A. Vaid, P. Castro, G. Ayala and M. Ittmann (2004). "The expression of Sprouty1, an inhibitor of fibroblast growth factor signal transduction, is decreased in human prostate cancer." Cancer Res **64**(14): 4728-4735.

Lambert, G., J. R. Bertrand, E. Fattal, F. Subra, H. Pinto-Alphandary, C. Malvy, C. Auclair and P. Couvreur (2000). "EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits ewing sarcoma-related tumor in mice." Biochem Biophys Res Commun **279**(2): 401-406.

Leavey, P. J. and A. B. Collier (2008). "Ewing sarcoma: prognostic criteria, outcomes and future treatment." Expert Rev Anticancer Ther **8**(4): 617-624.

Lee, S., T. M. Bui Nguyen, D. Kovalenko, N. Adhikari, S. Grindle, S. P. Polster, R. Friesel, S. Ramakrishnan and J. L. Hall (2010). "Sprouty1 inhibits angiogenesis in association with up-regulation of p21 and p27." Mol Cell Biochem **338**(1-2): 255-261.

Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **141**(7): 1117-1134.

Lessnick, S. L., B. S. Braun, C. T. Denny and W. A. May (1995). "Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene." Oncogene **10**(3): 423-431.

Lessnick, S. L. and M. Ladanyi (2012). "Molecular pathogenesis of Ewing sarcoma: new therapeutic and transcriptional targets." Annu Rev Pathol **7**: 145-159.

Li, E. and K. Hristova (2006). "Role of receptor tyrosine kinase transmembrane domains in cell signaling and human pathologies." Biochemistry **45**(20): 6241-6251.

- Li, X., V. G. Brunton, H. R. Burgar, L. M. Wheldon and J. K. Heath (2004). "FRS2-dependent SRC activation is required for fibroblast growth factor receptor-induced phosphorylation of Sprouty and suppression of ERK activity." *J Cell Sci* **117**(Pt 25): 6007-6017.
- Lim, J., E. S. Wong, S. H. Ong, P. Yusoff, B. C. Low and G. R. Guy (2000). "Sprouty proteins are targeted to membrane ruffles upon growth factor receptor tyrosine kinase activation. Identification of a novel translocation domain." *J Biol Chem* **275**(42): 32837-32845.
- Liu, X., Y. Lan, D. Zhang, K. Wang, Y. Wang and Z. C. Hua (2014). "SPRY1 promotes the degradation of uPAR and inhibits uPAR-mediated cell adhesion and proliferation." *Am J Cancer Res* **4**(6): 683-697.
- Liu, Z., X. Liu, W. Cao and Z. C. Hua (2015). "Tumor-specifically hypoxia-induced therapy of SPRY1/2 displayed differential therapeutic efficacy for melanoma." *Am J Cancer Res* **5**(2): 792-801.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4):402-8.
- Lo, T. L., P. Yusoff, C. W. Fong, K. Guo, B. J. McCaw, W. A. Phillips, H. Yang, E. S. Wong, H. F. Leong, Q. Zeng, T. C. Putti and G. R. Guy (2004). "The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer." *Cancer Res* **64**(17): 6127-6136.
- Long, J., Y. Wang, W. Wang, B. H. Chang and F. R. Danesh (2011). "MicroRNA-29c is a signature microRNA under high glucose conditions that targets Sprouty homolog 1, and its in vivo knockdown prevents progression of diabetic nephropathy." *J Biol Chem* **286**(13): 11837-11848.
- Low, H. B. and Y. Zhang (2016). "Regulatory Roles of MAPK Phosphatases in Cancer." *Immune Netw* **16**(2): 85-98.
- Macia, A., P. Gallel, M. Vaquero, M. Gou-Fabregas, M. Santacana, A. Maliszewska, M. Robledo, J. R. Gardiner, M. A. Basson, X. Matias-Guiu and M. Encinas (2012). "Sprouty1 is a candidate tumor-suppressor gene in medullary thyroid carcinoma." *Oncogene* **31**(35): 3961-3972.
- Macia, A., M. Vaquero, M. Gou-Fabregas, E. Castelblanco, J. M. Valdivielso, C. Anerillas, D. Mauricio, X. Matias-Guiu, J. Ribera and M. Encinas (2014). "Sprouty1 induces a senescence-associated secretory phenotype by regulating NFkappaB activity: implications for tumorigenesis." *Cell Death Differ* **21**(2): 333-343.
- Mackintosh, C., J. L. Ordonez, D. J. Garcia-Dominguez, V. Sevillano, A. Llombart-Bosch, K. Szuhai, K. Scotlandi, M. Alberghini, R. Sciot, F. Sinnaeve, P. C. Hogendoorn, P. Picci, S. Knuutila, U. Dirksen, M. Debiec-Rychter, K. L. Schaefer and E. de Alava (2012). "1q gain and CDT2 overexpression underlie an aggressive and highly proliferative form of Ewing sarcoma." *Oncogene* **31**(10): 1287-1298.

Mahoney Rogers, A. A., J. Zhang and K. Shim (2011). "Sprouty1 and Sprouty2 limit both the size of the otic placode and hindbrain Wnt8a by antagonizing FGF signaling." Dev Biol **353**(1): 94-104.

Manara, M. C., L. Landuzzi, P. Nanni, G. Nicoletti, D. Zambelli, P. L. Lollini, C. Nanni, F. Hofmann, C. Garcia-Echeverria, P. Picci and K. Scotlandi (2007). "Preclinical in vivo study of new insulin-like growth factor-I receptor-specific inhibitor in Ewing's sarcoma." Clin Cancer Res **13**(4): 1322-1330.

Mao, X., S. Miesfeldt, H. Yang, J. M. Leiden and C. B. Thompson (1994). "The FLI-1 and chimeric EWS-FLI-1 oncoproteins display similar DNA binding specificities." J Biol Chem **269**(27): 18216-18222.

Martins, A. S., C. Mackintosh, D. H. Martin, M. Campos, T. Hernandez, J. L. Ordonez and E. de Alava (2006). "Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin, or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor." Clin Cancer Res **12**(11 Pt 1): 3532-3540.

Mason, J. M., D. J. Morrison, B. Bassit, M. Dimri, H. Band, J. D. Licht and I. Gross (2004). "Tyrosine phosphorylation of Sprouty proteins regulates their ability to inhibit growth factor signaling: a dual feedback loop." Mol Biol Cell **15**(5): 2176-2188.

Masoumi-Moghaddam, S., A. Amini, A. Ehteda, A. Q. Wei and D. L. Morris (2014a). "The expression of the Sprouty 1 protein inversely correlates with growth, proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells." J Ovarian Res **7**: 61.

Masoumi-Moghaddam, S., A. Amini and D. L. Morris (2014b). "The developing story of Sprouty and cancer." Cancer Metastasis Rev **33**(2-3): 695-720.

Masoumi-Moghaddam, S., A. Amini, A. Q. Wei, G. Robertson and D. L. Morris (2015). "Sprouty 1 predicts prognosis in human epithelial ovarian cancer." Am J Cancer Res **5**(4): 1531-1541.

May, W. A., M. L. Gishizky, S. L. Lessnick, L. B. Lunsford, B. C. Lewis, O. Delattre, J. Zucman, G. Thomas and C. T. Denny (1993a). "Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(12): 5752-5756.

May, W. A., S. L. Lessnick, B. S. Braun, M. Klemsz, B. C. Lewis, L. B. Lunsford, R. Hromas and C. T. Denny (1993b). "The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1." Mol Cell Biol **13**(12): 7393-7398.

Meier, F., U. Caroli, K. Satyamoorthy, B. Schitteck, J. Bauer, C. Berking, H. Moller, E. Maczey, G. Rassner, M. Herlyn and C. Garbe (2003). "Fibroblast growth factor-2 but not Mel-CAM and/or beta3 integrin promotes progression of melanocytes to melanoma." Exp Dermatol **12**(3): 296-306.

Mekkawy, A. H. and D. L. Morris (2013). "Human sprouty1 suppresses urokinase receptor-stimulated cell migration and invasion." ISRN Biochem **2013**: 598251.

- Mekkawy, A. H., M. H. Pourgholami and D. L. Morris (2014). "Human Sprouty1 suppresses growth, migration, and invasion in human breast cancer cells." Tumour Biol **35**(5): 5037-5048.
- Mendiola, M., J. Carrillo, E. Garcia, E. Lalli, T. Hernandez, E. de Alava, F. Tirode, O. Delattre, P. Garcia-Miguel, F. Lopez-Barea, A. Pestana and J. Alonso (2006). "The orphan nuclear receptor DAX1 is up-regulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and is highly expressed in Ewing tumors." Int J Cancer **118**(6): 1381-1389.
- Minowada, G., L. A. Jarvis, C. L. Chi, A. Neubuser, X. Sun, N. Hacohen, M. A. Krasnow and G. R. Martin (1999). "Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed." Development **126**(20): 4465-4475.
- Mitsiades, C. S., N. Mitsiades and M. Koutsilieris (2004). "The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development." Curr Cancer Drug Targets **4**(3): 235-256.
- Miyagawa, Y., H. Okita, H. Nakaijima, Y. Horiuchi, B. Sato, T. Taguchi, M. Toyoda, Y. U. Katagiri, J. Fujimoto, J. Hata, A. Umezawa and N. Kiyokawa (2008). "Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells." Mol Cell Biol **28**(7): 2125-2137.
- Miyoshi, K., T. Wakioka, H. Nishinakamura, M. Kamio, L. Yang, M. Inoue, M. Hasegawa, Y. Yonemitsu, S. Komiya and A. Yoshimura (2004). "The Sprouty-related protein, Spred, inhibits cell motility, metastasis, and Rho-mediated actin reorganization." Oncogene **23**(33): 5567-5576.
- Moghaddam, S. M., A. Amini, A. Q. Wei, M. H. Pourgholami and D. L. Morris (2012). "Initial report on differential expression of sprouty proteins 1 and 2 in human epithelial ovarian cancer cell lines." J Oncol **2012**: 373826.
- Mohammadi, M., S. Froum, J. M. Hamby, M. C. Schroeder, R. L. Panek, G. H. Lu, A. V. Eliseenkova, D. Green, J. Schlessinger and S. R. Hubbard (1998). "Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain." EMBO J **17**(20): 5896-5904.
- Naing, A., P. LoRusso, S. Fu, D. S. Hong, P. Anderson, R. S. Benjamin, J. Ludwig, H. X. Chen, L. A. Doyle and R. Kurzrock (2012). "Insulin growth factor-receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with refractory Ewing's sarcoma family tumors." Clin Cancer Res **18**(9): 2625-2631.
- Navarro, D., N. Agra, A. Pestana, J. Alonso and J. M. Gonzalez-Sancho (2010). "The EWS/FLI1 oncogenic protein inhibits expression of the Wnt inhibitor DICKKOPF-1 gene and antagonizes beta-catenin/TCF-mediated transcription." Carcinogenesis **31**(3): 394-401.
- Nichols, W. W., D. G. Murphy, V. J. Cristofalo, L. H. Toji, A. E. Greene and S. A. Dwight (1977). "Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90." Science **196**(4285): 60-63.

Noguera, R., T. J. Triche, S. Navarro, M. Tsokos and A. Llombart-Bosch (1992). "Dynamic model of differentiation in Ewing's sarcoma cells. Comparative analysis of morphologic, immunocytochemical, and oncogene expression parameters." Lab Invest **66**(2): 143-151.

O'Regan, S., M. F. Diebler, F. M. Meunier and S. Vyas (1995). "A Ewing's sarcoma cell line showing some, but not all, of the traits of a cholinergic neuron." J Neurochem **64**(1): 69-76.

Ohno, T., V. N. Rao and E. S. Reddy (1993). "EWS/Fli-1 chimeric protein is a transcriptional activator." Cancer Res **53**(24): 5859-5863.

Olmos, D., S. Postel-Vinay, L. R. Molife, S. H. Okuno, S. M. Schuetze, M. L. Paccagnella, G. N. Batzel, D. Yin, K. Pritchard-Jones, I. Judson, F. P. Worden, A. Gualberto, M. Scurr, J. S. de Bono and P. Haluska (2010). "Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the anti-IGF-1R antibody figitumumab (CP-751,871) in patients with sarcoma and Ewing's sarcoma: a phase 1 expansion cohort study." Lancet Oncol **11**(2): 129-135.

Ordonez, J. L., A. T. Amaral, A. M. Carcaboso, D. Herrero-Martin, M. del Carmen Garcia-Macias, V. Sevillano, D. Alonso, G. Pascual-Pasto, L. San-Segundo, M. Vila-Ubach, T. Rodrigues, S. Fraile, C. Teodosio, A. Mayo-Iscar, M. Aracil, C. M. Galmarini, O. M. Tirado, J. Mora and E. de Alava (2015). "The PARP inhibitor olaparib enhances the sensitivity of Ewing sarcoma to trabectedin." Oncotarget **6**(22): 18875-18890.

Ornitz, D. M. and N. Itoh (2015). "The Fibroblast Growth Factor signaling pathway." Wiley Interdiscip Rev Dev Biol **4**(3): 215-266.

Osgood, C. L., N. Maloney, C. G. Kidd, S. M. Kitchen-Goosen, L. E. Segars, M. Gebregiorgis, G. M. Woldemichael, M. He, S. Sankar, S. L. Lessnick, M. H. Kang, M. A. Smith, L. Turner, Z. B. Madaj, M. E. Winn, L. E. Nunez, J. Gonzalez-Sabin, L. J. Helman, F. Moris and P. J. Grohar (2016). "Identification of mithramycin analogs with improved targeting of the EWS-FLI1 transcription factor." Clin Cancer Res.

Ouchida, M., T. Ohno, Y. Fujimura, V. N. Rao and E. S. Reddy (1995). "Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts." Oncogene **11**(6): 1049-1054.

Ozaki, K., S. Miyazaki, S. Tanimura and M. Kohno (2005). "Efficient suppression of FGF-2-induced ERK activation by the cooperative interaction among mammalian Sprouty isoforms." J Cell Sci **118**(Pt 24): 5861-5871.

Panek, R. L., G. H. Lu, T. K. Dahring, B. L. Batley, C. Connolly, J. M. Hamby and K. J. Brown (1998). "In vitro biological characterization and antiangiogenic effects of PD 166866, a selective inhibitor of the FGF-1 receptor tyrosine kinase." J Pharmacol Exp Ther **286**(1): 569-577.

Pappo, A. S., G. Vassal, J. J. Crowley, V. Bolejack, P. C. Hogendoorn, R. Chugh, M. Ladanyi, J. F. Grippo, G. Dall, A. P. Staddon, S. P. Chawla, R. G. Maki, D. M. Araujo,

- B. Geoerger, K. Ganjoo, N. Marina, J. Y. Blay, S. M. Schuetze, W. A. Chow and L. J. Helman (2014). "A phase 2 trial of R1507, a monoclonal antibody to the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R), in patients with recurrent or refractory rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, synovial sarcoma, and other soft tissue sarcomas: results of a Sarcoma Alliance for Research Through Collaboration study." Cancer **120**(16): 2448-2456.
- Pasqualato, A., V. Lei, A. Cucina, S. Dinicola, F. D'Anselmi, S. Proietti, M. G. Masiello, A. Palombo and M. Bizzarri (2013). "Shape in migration: quantitative image analysis of migrating chemoresistant HCT-8 colon cancer cells." Cell Adh Migr **7**(5): 450-459.
- Patel, M., J. M. Simon, M. D. Iglesia, S. B. Wu, A. W. McFadden, J. D. Lieb and I. J. Davis (2012). "Tumor-specific retargeting of an oncogenic transcription factor chimera results in dysregulation of chromatin and transcription." Genome Res **22**(2): 259-270.
- Perlman, E. J., P. S. Dickman, F. B. Askin, H. E. Grier, J. S. Miser and M. P. Link (1994). "Ewing's sarcoma--routine diagnostic utilization of MIC2 analysis: a Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group Intergroup Study." Hum Pathol **25**(3): 304-307.
- Peter, M., J. Couturier, H. Pacquement, J. Michon, G. Thomas, H. Magdelenat and O. Delattre (1997). "A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors." Oncogene **14**(10): 1159-1164.
- Ponten, J. and E. Saksela (1967). "Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours." Int J Cancer **2**(5): 434-447.
- Postel-Vinay, S., A. S. Veron, F. Tirode, G. Pierron, S. Reynaud, H. Kovar, O. Oberlin, E. Lapouble, S. Ballet, C. Lucchesi, U. Kontny, A. Gonzalez-Neira, P. Picci, J. Alonso, A. Patino-Garcia, B. B. de Paillerets, K. Laud, C. Dina, P. Froguel, F. Clavel-Chapelon, F. Doz, J. Michon, S. J. Chanock, G. Thomas, D. G. Cox and O. Delattre (2012). "Common variants near TARDBP and EGR2 are associated with susceptibility to Ewing sarcoma." Nat Genet **44**(3): 323-327.
- Potluri, V. R., F. Gilbert, C. Helsen and L. Helson (1987). "Primitive neuroectodermal tumor cell lines: chromosomal analysis of five cases." Cancer Genet Cytogenet **24**(1): 75-86.
- Powers, C. J., S. W. McLeskey and A. Wellstein (2000). "Fibroblast growth factors, their receptors and signaling." Endocr Relat Cancer **7**(3): 165-197.
- Prieur, A., F. Tirode, P. Cohen and O. Delattre (2004). "EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3." Mol Cell Biol **24**(16): 7275-7283.
- Purcell, P., A. Jheon, M. P. Vivero, H. Rahimi, A. Joo and O. D. Klein (2012). "Spry1 and spry2 are essential for development of the temporomandibular joint." J Dent Res **91**(4): 387-393.

Regad, T. (2015). "Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer." Cancers (Basel) **7**(3): 1758-1784.

Richter, G. H., S. Plehm, A. Fasan, S. Rossler, R. Unland, I. M. Bennani-Baiti, M. Hotfilder, D. Lowel, I. von Luetlichau, I. Mossbrugger, L. Quintanilla-Martinez, H. Kovar, M. S. Staeger, C. Muller-Tidow and S. Burdach (2009). "EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(13): 5324-5329.

Riggi, N., B. Knoechel, S. M. Gillespie, E. Rheinbay, G. Boulay, M. L. Suva, N. E. Rossetti, W. E. Boonseng, O. Oksuz, E. B. Cook, A. Formey, A. Patel, M. Gymrek, V. Thapar, V. Deshpande, D. T. Ting, F. J. Hornicek, G. P. Nielsen, I. Stamenkovic, M. J. Aryee, B. E. Bernstein and M. N. Rivera (2014). "EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma." Cancer Cell **26**(5): 668-681.

Riggi, N., M. L. Suva, C. De Vito, P. Provero, J. C. Stehle, K. Baumer, L. Cironi, M. Janiszewska, T. Petricevic, D. Suva, S. Tercier, J. M. Joseph, L. Guillou and I. Stamenkovic (2010). "EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells." Genes Dev **24**(9): 916-932.

Riggi, N., M. L. Suva and I. Stamenkovic (2009). "Ewing's sarcoma origin: from duel to duality." Expert Rev Anticancer Ther **9**(8): 1025-1030.

Riggi, N., M. L. Suva, D. Suva, L. Cironi, P. Provero, S. Tercier, J. M. Joseph, J. C. Stehle, K. Baumer, V. Kindler and I. Stamenkovic (2008). "EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells." Cancer Res **68**(7): 2176-2185.

Rodriguez-Galindo, C., S. L. Spunt and A. S. Pappo (2003). "Treatment of Ewing sarcoma family of tumors: current status and outlook for the future." Med Pediatr Oncol **40**(5): 276-287.

Sabatel, C., A. M. Cornet, S. P. Tabruyn, L. Malvaux, K. Castermans, J. A. Martial and I. Struman (2010). "Sprouty1, a new target of the angiostatic agent 16K prolactin, negatively regulates angiogenesis." Mol Cancer **9**: 231.

Salsmann, A., E. Schaffner-Reckinger and N. Kieffer (2006). "RGD, the Rho'd to cell spreading." Eur J Cell Biol **85**(3-4): 249-254.

Sankar, S., R. Bell, B. Stephens, R. Zhuo, S. Sharma, D. J. Bearss and S. L. Lessnick (2013). "Mechanism and relevance of EWS/FLI-mediated transcriptional repression in Ewing sarcoma." Oncogene **32**(42): 5089-5100.

Sathyanarayana, P., A. Dev, A. Pradeep, M. Ufkin, J. D. Licht and D. M. Wojchowski (2012). "Spry1 as a novel regulator of erythropoiesis, EPO/EPOR target, and suppressor of JAK2." Blood **119**(23): 5522-5531.

- Scotlandi, K., S. Avnet, S. Benini, M. C. Manara, M. Serra, V. Cerisano, S. Perdichizzi, P. L. Lollini, C. De Giovanni, L. Landuzzi and P. Picci (2002a). "Expression of an IGF-I receptor dominant negative mutant induces apoptosis, inhibits tumorigenesis and enhances chemosensitivity in Ewing's sarcoma cells." Int J Cancer **101**(1): 11-16.
- Scotlandi, K., S. Benini, P. Nanni, P. L. Lollini, G. Nicoletti, L. Landuzzi, M. Serra, M. C. Manara, P. Picci and N. Baldini (1998). "Blockage of insulin-like growth factor-I receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice." Cancer Res **58**(18): 4127-4131.
- Scotlandi, K., C. Maini, M. C. Manara, S. Benini, M. Serra, V. Cerisano, R. Strammiello, N. Baldini, P. L. Lollini, P. Nanni, G. Nicoletti and P. Picci (2002b). "Effectiveness of insulin-like growth factor I receptor antisense strategy against Ewing's sarcoma cells." Cancer Gene Ther **9**(3): 296-307.
- Schoffski, P., D. Adkins, J. Y. Blay, T. Gil, A. D. Elias, P. Rutkowski, G. K. Pennock, H. Youssoufian, H. Gelderblom, R. Willey and D. O. Grebennik (2013). "An open-label, phase 2 study evaluating the efficacy and safety of the anti-IGF-1R antibody cixutumumab in patients with previously treated advanced or metastatic soft-tissue sarcoma or Ewing family of tumours." Eur J Cancer **49**(15): 3219-3228.
- Schubbert, S., K. Shannon and G. Bollag (2007). "Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer." Nat Rev Cancer **7**(4): 295-308.
- Seeger, R. C., S. A. Rayner, A. Banerjee, H. Chung, W. E. Laug, H. B. Neustein and W. F. Benedict (1977). "Morphology, growth, chromosomal pattern and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines." Cancer Res **37**(5): 1364-1371.
- Segaliny, A. I., M. Tellez-Gabriel, M. F. Heymann and D. Heymann (2015). "Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers." J Bone Oncol **4**(1): 1-12.
- Sharma, B., S. Joshi, A. Sassano, B. Majchrzak, S. Kaur, P. Aggarwal, B. Nabet, M. Bulic, B. L. Stein, B. McMahon, D. P. Baker, R. Fukunaga, J. K. Altman, J. D. Licht, E. N. Fish and L. C. Platanias (2012). "Sprouty proteins are negative regulators of interferon (IFN) signaling and IFN-inducible biological responses." J Biol Chem **287**(50): 42352-42360.
- Shaw, A. T., P. P. Hsu, M. M. Awad and J. A. Engelman (2013). "Tyrosine kinase gene rearrangements in epithelial malignancies." Nat Rev Cancer **13**(11): 772-787.
- Shea, K. L., W. Xiang, V. S. LaPorta, J. D. Licht, C. Keller, M. A. Basson and A. S. Brack (2010). "Sprouty1 regulates reversible quiescence of a self-renewing adult muscle stem cell pool during regeneration." Cell Stem Cell **6**(2): 117-129.
- Shim, K., G. Minowada, D. E. Coling and G. R. Martin (2005). "Sprouty2, a mouse deafness gene, regulates cell fate decisions in the auditory sensory epithelium by antagonizing FGF signaling." Dev Cell **8**(4): 553-564.

Shin, E. H., M. A. Basson, M. L. Robinson, J. W. McAvoy and F. J. Lovicu (2012). "Sprouty is a negative regulator of transforming growth factor beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition and cataract." Mol Med **18**: 861-873.

Shing, D. C., D. J. McMullan, P. Roberts, K. Smith, S. F. Chin, J. Nicholson, R. M. Tillman, P. Ramani, C. Cullinane and N. Coleman (2003). "FUS/ERG gene fusions in Ewing's tumors." Cancer Res **63**(15): 4568-4576.

Sirivatanauksorn, Y., V. Sirivatanauksorn, C. Srisawat, A. Khongmanee and C. Tongkham (2012). "Differential expression of sprouty genes in hepatocellular carcinoma." J Surg Oncol **105**(3): 273-276.

Smilenov, L. B., A. Mikhailov, R. J. Pelham, E. E. Marcantonio and G. G. Gundersen (1999). "Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts." Science **286**(5442): 1172-1174.

Smith, R., L. A. Owen, D. J. Trem, J. S. Wong, J. S. Whangbo, T. R. Golub and S. L. Lessnick (2006). "Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma." Cancer Cell **9**(5): 405-416.

Sorensen, P. H., S. L. Lessnick, D. Lopez-Terrada, X. F. Liu, T. J. Triche and C. T. Denny (1994). "A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG." Nat Genet **6**(2): 146-151.

Staeger, M. S., C. Hutter, I. Neumann, S. Foja, U. E. Hattenhorst, G. Hansen, D. Afar and S. E. Burdach (2004). "DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets." Cancer Res **64**(22): 8213-8221.

Sturla, L. M., G. Westwood, P. J. Selby, I. J. Lewis and S. A. Burchill (2000). "Induction of cell death by basic fibroblast growth factor in Ewing's sarcoma." Cancer Res **60**(21): 6160-6170.

Sugimoto, T., E. Tatsumi, J. T. Kemshead, L. Helson, A. A. Green and J. Minowada (1984). "Determination of cell surface membrane antigens common to both human neuroblastoma and leukemia-lymphoma cell lines by a panel of 38 monoclonal antibodies." J Natl Cancer Inst **73**(1): 51-57.

Sun, L., N. Tran, C. Liang, F. Tang, A. Rice, R. Schreck, K. Waltz, L. K. Shawver, G. McMahon and C. Tang (1999). "Design, synthesis, and evaluations of substituted 3-[(3- or 4-carboxyethylpyrrol-2-yl)methylidene]indolin-2-ones as inhibitors of VEGF, FGF, and PDGF receptor tyrosine kinases." J Med Chem **42**(25): 5120-5130.

Surdez, D., M. Benetkiewicz, V. Perrin, Z. Y. Han, G. Pierron, S. Ballet, F. Lamoureux, F. Redini, A. V. Decouvelaere, E. Daudigeos-Dubus, B. Georger, G. de Pinieux, O. Delattre and F. Tirode (2012). "Targeting the EWSR1-FLI1 oncogene-induced protein kinase PKC-beta abolishes ewing sarcoma growth." Cancer Res **72**(17): 4494-4503.

Takahashi, M., D. R. Rhodes, K. A. Furge, H. Kanayama, S. Kagawa, B. B. Haab and B. T. Teh (2001). "Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene

identification and prognostic classification." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9754-9759.

Tanaka, K., T. Iwakuma, K. Harimaya, H. Sato and Y. Iwamoto (1997). "EWS-Flt1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells." J Clin Invest **99**(2): 239-247.

Taniguchi, K., T. Ayada, K. Ichiyama, R. Kohno, Y. Yonemitsu, Y. Minami, A. Kikuchi, Y. Maehara and A. Yoshimura (2007). "Sprouty2 and Sprouty4 are essential for embryonic morphogenesis and regulation of FGF signaling." Biochem Biophys Res Commun **352**(4): 896-902.

Terada, N., T. Shiraishi, Y. Zeng, K. M. Aw-Yong, S. M. Mooney, Z. Liu, S. Takahashi, J. Luo, S. E. Lupold, P. Kulkarni and R. H. Getzenberg (2014). "Correlation of Sprouty1 and Jagged1 with aggressive prostate cancer cells with different sensitivities to androgen deprivation." J Cell Biochem **115**(9): 1505-1515.

Thompson, A. D., M. A. Teitell, A. Arvand and C. T. Denny (1999). "Divergent Ewing's sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumorigenic phenotype on NIH3T3 cells." Oncogene **18**(40): 5506-5513.

Tirole, F., K. Laud-Duval, A. Prieur, B. Delorme, P. Charbord and O. Delattre (2007). "Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors." Cancer Cell **11**(5): 421-429.

Tirole, F., D. Surdez, X. Ma, M. Parker, M. C. Le Deley, A. Bahrami, Z. Zhang, E. Lapouble, S. Grossetete-Lalami, M. Rusch, S. Reynaud, T. Rio-Frio, E. Hedlund, G. Wu, X. Chen, G. Pierron, O. Oberlin, S. Zaidi, G. Lemmon, P. Gupta, B. Vadodaria, J. Easton, M. Gut, L. Ding, E. R. Mardis, R. K. Wilson, S. Shurtleff, V. Laurence, J. Michon, P. Marec-Berard, I. Gut, J. Downing, M. Dyer, J. Zhang, O. Delattre, P. St. Jude Children's Research Hospital-Washington University Pediatric Cancer Genome and C. the International Cancer Genome (2014). "Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations." Cancer Discov **4**(11): 1342-1353.

Tomazou, E. M., N. C. Sheffield, C. Schmidl, M. Schuster, A. Schonegger, P. Datlinger, S. Kubicek, C. Bock and H. Kovar (2015). "Epigenome mapping reveals distinct modes of gene regulation and widespread enhancer reprogramming by the oncogenic fusion protein EWS-FLI1." Cell Rep **10**(7): 1082-1095.

Toretzky, J. A., Y. Connell, L. Neckers and N. K. Bhat (1997). "Inhibition of EWS-FLI-1 fusion protein with antisense oligodeoxynucleotides." J Neurooncol **31**(1-2): 9-16.

Toretzky, J. A., V. Erkizan, A. Levenson, O. D. Abaan, J. D. Parvin, T. P. Cripe, A. M. Rice, S. B. Lee and A. Uren (2006). "Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A." Cancer Res **66**(11): 5574-5581.

Touat, M., E. Ileana, S. Postel-Vinay, F. Andre and J. C. Soria (2015). "Targeting FGFR Signaling in Cancer." Clin Cancer Res **21**(12): 2684-2694.

Triche, T. J. (1988). "Diagnosis of small round cell tumors of childhood." Bull Cancer **75**(3): 297-310.

Truong, A. H. and Y. Ben-David (2000). "The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation." Oncogene **19**(55): 6482-6489.

Tsumura, Y., J. Toshima, Onno C. Leeksa, K. Ohashi and K. Mizuno (2005). "Sprouty-4 negatively regulates cell spreading by inhibiting the kinase activity of testicular protein kinase." Biochemical Journal **387**(Pt 3): 627-637.

Tumilowicz, J. J., W. W. Nichols, J. J. Cholon and A. E. Greene (1970). "Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma." Cancer Res **30**(8): 2110-2118.

Urano, F., A. Umezawa, H. Yabe, W. Hong, K. Yoshida, K. Fujinaga and J. Hata (1998). "Molecular analysis of Ewing's sarcoma: another fusion gene, EWS-E1AF, available for diagnosis." Jpn J Cancer Res **89**(7): 703-711.

Urs, S., T. Henderson, P. Le, C. J. Rosen and L. Liaw (2012). "Tissue-specific expression of Sprouty1 in mice protects against high-fat diet-induced fat accumulation, bone loss and metabolic dysfunction." Br J Nutr **108**(6): 1025-1033.

Urs, S., D. Venkatesh, Y. Tang, T. Henderson, X. Yang, R. E. Friesel, C. J. Rosen and L. Liaw (2010). "Sprouty1 is a critical regulatory switch of mesenchymal stem cell lineage allocation." FASEB J **24**(9): 3264-3273.

von Levetzow, C., X. Jiang, Y. Gwyne, G. von Levetzow, L. Hung, A. Cooper, J. H. Hsu and E. R. Lawlor (2011). "Modeling initiation of Ewing sarcoma in human neural crest cells." PLoS One **6**(4): e19305.

Wakioka, T., A. Sasaki, R. Kato, T. Shouda, A. Matsumoto, K. Miyoshi, M. Tsuneoka, S. Komiya, R. Baron and A. Yoshimura (2001). "Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling." Nature **412**(6847): 647-651.

Whang-Peng, J., T. J. Triche, T. Knutsen, J. Miser, E. C. Douglass and M. A. Israel (1984). "Chromosome translocation in peripheral neuroepithelioma." N Engl J Med **311**(9): 584-585.

Wiles, E. T., B. Lui-Sargent, R. Bell and S. L. Lessnick (2013). "BCL11B is up-regulated by EWS/FLI and contributes to the transformed phenotype in Ewing sarcoma." PLoS One **8**(3): e59369.

Xu, H. F., Y. J. Ding, Z. X. Zhang, Z. F. Wang, C. L. Luo, B. X. Li, Y. W. Shen, L. Y. Tao and Z. Q. Zhao (2014). "MicroRNA21 regulation of the progression of viral myocarditis to dilated cardiomyopathy." Mol Med Rep **10**(1): 161-168.

Yang, X., Y. Gong, Y. Tang, H. Li, Q. He, L. Gower, L. Liaw and R. E. Friesel (2013). "Spry1 and Spry4 differentially regulate human aortic smooth muscle cell phenotype via Akt/FoxO/myocardin signaling." PLoS One **8**(3): e58746.

Yee, D., R. E. Favoni, G. S. Lebovic, F. Lombana, D. R. Powell, C. P. Reynolds and N. Rosen (1990). "Insulin-like growth factor I expression by tumors of neuroectodermal origin with the t(11;22) chromosomal translocation. A potential autocrine growth factor." J Clin Invest **86**(6): 1806-1814.

Yi, H., Y. Fujimura, M. Ouchida, D. D. Prasad, V. N. Rao and E. S. Reddy (1997). "Inhibition of apoptosis by normal and aberrant Fli-1 and erg proteins involved in human solid tumors and leukemias." Oncogene **14**(11): 1259-1268.

Yilmaz, M. and G. Christofori (2010). "Mechanisms of motility in metastasizing cells." Mol Cancer Res **8**(5): 629-642.

Zhao, Z., J. Zuber, E. Diaz-Flores, L. Lintault, S. C. Kogan, K. Shannon and S. W. Lowe (2010). "p53 loss promotes acute myeloid leukemia by enabling aberrant self-renewal." Genes Dev **24**(13): 1389-1402.

Zoubek, A., C. Pfeleiderer, M. Salzer-Kuntschik, G. Amann, R. Windhager, F. M. Fink, E. Koscielniak, O. Delattre, S. Strehl, P. F. Ambros and *et al.* (1994). "Variability of EWS chimaeric transcripts in Ewing tumours: a comparison of clinical and molecular data." Br J Cancer **70**(5): 908-913.

Zucman, J., T. Melot, C. Desmaze, J. Ghysdael, B. Plougastel, M. Peter, J. M. Zucker, T. J. Triche, D. Sheer, C. Turc-Carel and *et al.* (1993). "Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours." EMBO J **12**(12): 4481-4487.

8. Anexos

8.1 Material Suplementario

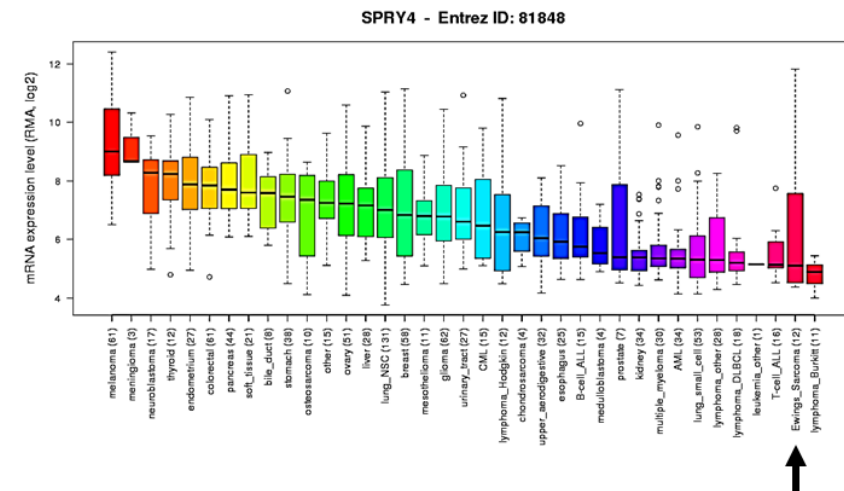
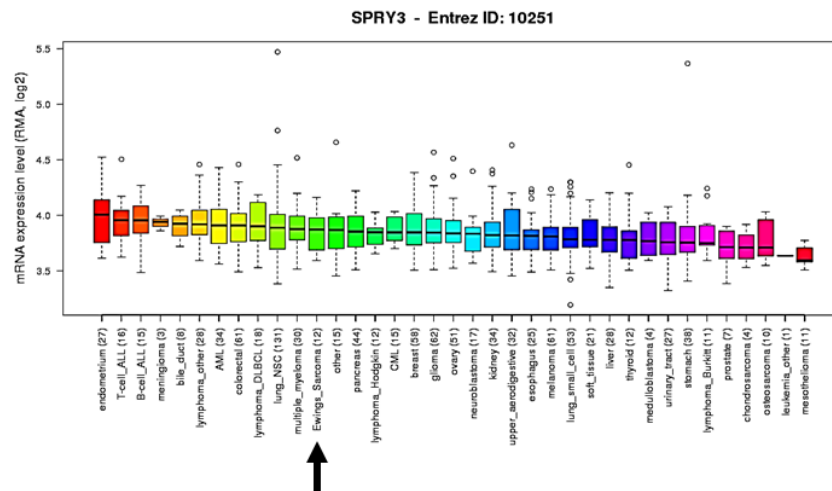
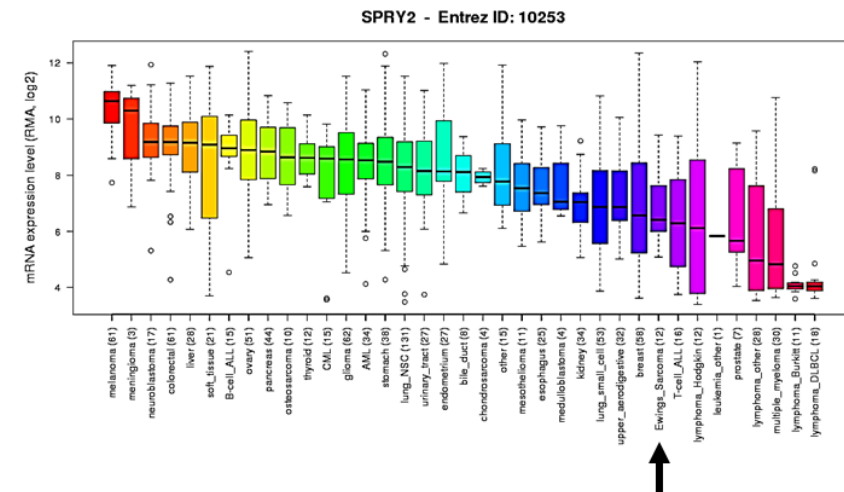
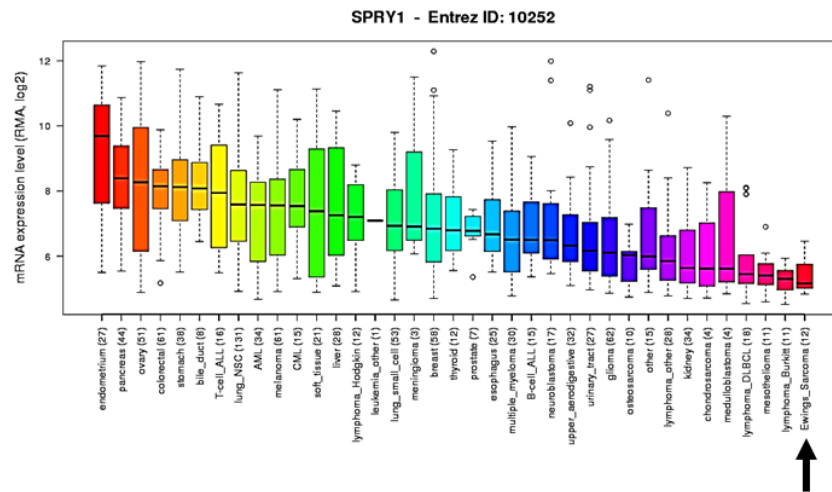


Figura Suplementaria 1. El sarcoma de Ewing presenta los niveles de expresión de SPRY1 más bajos de todos los tumores disponibles en la *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE). El análisis de los datos de expresión génica para SPRY1, -2, -3 and -4 utilizando los datos de la CCLE (datos disponibles en <http://www.broadinstitute.org/ccle> (Barretina *et al.* 2012)) muestra que el sarcoma de Ewing presenta los niveles de expresión de SPRY1 más bajos de todos los tumores sólidos estudiados, a diferencia de lo que se observa para SPRY2, -3 y -4.

Tabla Suplementaria 1. Niveles de expresión de las líneas celulares analizadas en la CCLE (*Cancer Cell Line Encyclopedia*). Se muestra la posición que ocupan sobre un total de 1036 líneas celulares analizadas en función del nivel de expresión de SPY1.

<i>Posición (1036)</i>	<i>Línea Celular</i>	<i>Nivel de Expresión SPY1</i>
1028	U2OS	4,740753
942	SAOS-2	5,21578
829	IMR32	5,59917
488	SKNSH	7,227691
626	SHSY5Y	6,493132
2	SKNAS	11,99227
288	SJRH30	8,223732
770	A673	5,849319

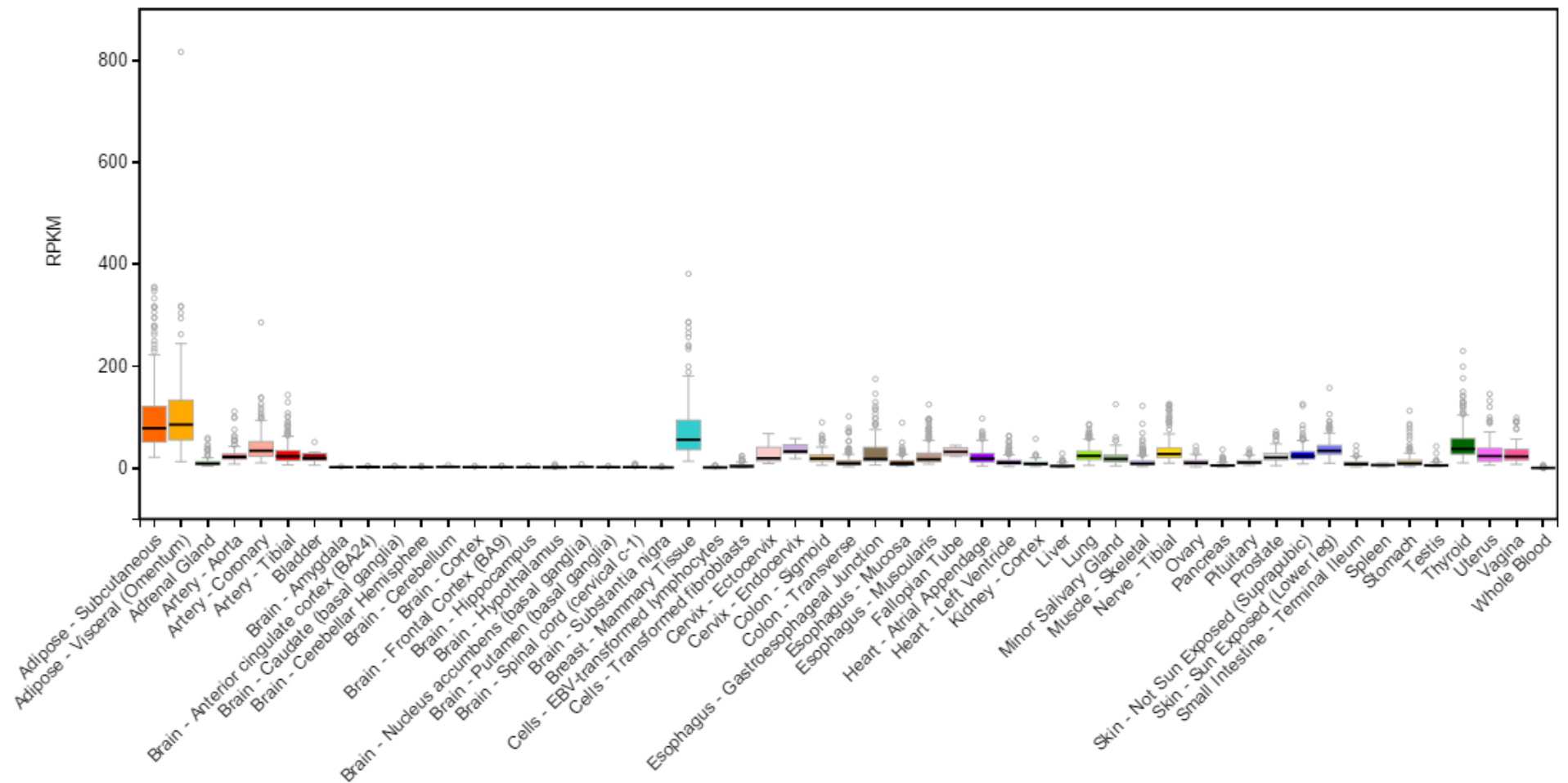


Figura Suplementaria 2. Expresión de SPRY1 en tejidos normales. La figura muestra datos del portal GTEx (<http://gtexportal.org>), provenientes del *GTEx Analysis Release V6* (*dbGaP Accession phs000424.v6.p1*) donde se observa que SPRY1 se expresa en mayor medida en tejido adiposo y mama. Los rectángulos muestran el valor medio de expresión y los percentiles 25 y 75. Los puntos muestran los valores atípicos.

8.2. Publicaciones

Los resultados presentados en esta Tesis han sido parcialmente publicados en el siguiente artículo:

Cidre-Aranaz F, Grünewald TGP, Surdez D, García-García L, Lázaro JC, Kirchner T, González-González L, Sastre A, García-Miguel P, López-Pérez SE, Monzón S, Delattre O, Alonso J. EWS-FLI1-mediated suppression of the RAS-antagonist Sprouty1 (SPRY1) confers aggressiveness to Ewing sarcoma. **Oncogene** 2016.

Además, durante el transcurso de la Tesis se han publicado los siguientes artículos en los que el doctorando ha participado:

Agra N*, Cidre F*, Garcia-Garcia L, de la Parra J, Alonso J. Lysyl oxidase is downregulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and its propeptide domain displays tumor suppressor activities in Ewing sarcoma cells. **PLoS One** 2013;8(6):e66281.

Cidre-Aranaz F, Alonso J. EWS/FLI1 Target Genes and Therapeutic Opportunities in Ewing Sarcoma. **Front Oncol** 2015;5:162.

Grunewald TG, Bernard V, Gilardi-Hebenstreit P, Raynal V, Surdez D, Aynaud MM, Mirabeau O, Cidre-Aranaz F, Tirode F, Zaidi S, *et al.* Chimeric EWSR1-FLI1 regulates the Ewing sarcoma susceptibility gene EGR2 via a GGAA microsatellite. **Nat Genet** 2015;47(9):1073-8.

Kovar H, Amatruda J, Brunet E, Burdach S, Cidre-Aranaz F, de Alava E, *et al.* The second European interdisciplinary Ewing sarcoma research summit - A joint effort to deconstructing the multiple layers of a complex disease. **Oncotarget** 2016;7(8):8613-24.

Rodriguez-Martin C, Cidre F, Fernandez-Teijeiro A, Gomez-Mariano G, de la Vega L, Ramos P, *et al.* Familial retinoblastoma due to intronic LINE-1 insertion causes aberrant and noncanonical mRNA splicing of the RB1 gene. **J Hum Genet** 2016.

